

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. C.-J. Estler

Freisetzung des Darmhormons Motilin aus Schweinemucosa in vitro

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Rudolf K. König
aus Schönhaid



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546215_0014

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. C.-J. Estler

Freisetzung des Darmhormons Motilin aus Schweinemucosa in vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Rudolf K. König
aus Schönhaid

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. W. Kersten
Referent : Prof. Dr. P. Mitznegg
Koreferent : Prof. Dr. C.-J. Estler

Tag der mündlichen Prüfung : 21.07.1980

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Versuchsbeschreibung	
	A. Versuchsaufbau	7
	B. Versuchsdurchführung	11
	C. Radioimmunoassay	12
III.	Ergebnisse und Diskussion	
	A. Stimulationsversuche	
	1. Salzsäure	
	a) Bolusstimulation	15
	b) Stimulation mit verschie- denen festen pH - Werten	20
	2. Reizung mit Laugen	
	a) Natronlauge	26
	b) Stimulation mit Tris - - (Hydroxymethyl) aminomethan ..	29
	c) Bolusstimulation mit Natriumbikarbonat	31
	3. Stimulation mit Cholsäure	
	a) Entdeckung der Chol- säure als Stimulator	35
	b) Reizung mit verschie- denen Cholsäurekonzentrationen ...	36
	c) Versuche mit hoher Cholsäurekonzentration	43
	d) Versuch zum Cholsäurereizoptimum..	46
	4. Stimulation mit Äthylalkohol	54

5.	Testung verschiedener	
	organischer Verbindungen ..	57
	a) Triglyceride	57
	b) Pentagastrin	59
	c) Acetylcholin	59
	d) Noradrenalin	60
	e) Cholecystokinin (CCK)	60
B.	Hemmversuche	62
1.	Kalziumionenfreie Nährlösung	62
2.	Orciprenalin und Adrenalin	65
3.	Verapamil	68
4.	Glucagon und Insulin	69
5.	Pentagastrin	69
IV.	Synopsis	71
V.	Zusammenfassung	74
VI.	Literaturverzeichnis	75

I. Einleitung

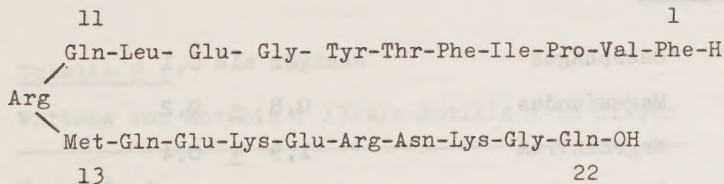
Motilin ist ein relativ junges Mitglied der Familie hormonaktiver Peptide aus dem Magen-Darm-Trakt : Es wurde 1971 von John Brown (1) als Beiprodukt bei der Reinigung von Rohsekretin isoliert und erhielt seinen Namen, weil es beim Hund, intravenös injiziert, die Motilität von Magentaschen stimulierte (2).

Chemisch ist Motilin ein lineares Polypeptid aus 22 Aminosäuren, das strukturell weder der Gastrin- noch der Sekretin-Familie zuzuordnen ist (Abb. 1).

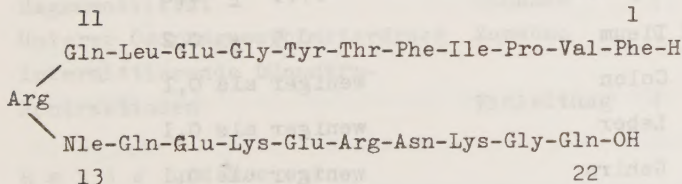
Abbildung 1

Aminosäuresequenz von Motilin und 13-Nle-Motilin

M o t i l i n



N o r l e u c i n - M o t i l i n



1973 wurde am Max Plank Institut für Biochemie in München ein Analogon des Motilins **synthetisiert** , bei dem das Methionin in Position 13 durch Norleucin ersetzt ist (3). Nach allen bisher vorliegenden Untersuchungen ist diese Verbindung sowohl biologisch (4 , 5) als auch immunologisch (4 , 6) dem natürlichen Motilin wirkungsgleich.

Über die physiologische Bedeutung des Motilins ist bisher noch wenig bekannt. Wir wissen, daß das Peptid im Plasma zirkuliert und in enterochromaffinen Zellen des Magen-Darm-Trakts gespeichert ist . In Tabelle 1 sind die Gewebskonzentrationen von Motilin in unterschiedlichen Regionen des Magen-Darm-Trakts des Menschen angegeben.

Tabelle 1 :

Oesophagus	weniger als 0,1
Magenfundus	0,8 $\pm$ 0,2
Magenantrum	1,9 $\pm$ 0,4
Pancreas	weniger als 0,1
Duodenum	165,7 $\pm$ 15,9
Jejunum	37,5 $\pm$ 2,8
Ileum	0,5 $\pm$ 0,2
Colon	weniger als 0,1
Leber	weniger als 0,1
Gehirn	weniger als 0,1

Motilingehalt in pmol / l Feuchtgewicht (Gesamte Dicke

der Gewebsschicht). Alle angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte ($\pm$ SEM) von Proben, die von Vier getrennten Individuen gewonnen wurden. (Aus : S.R. Bloom, P. Mitznegg & M.G. Bryant. Measurement of Human Plasma Motilin. Scand.J.Gastroent. 1976, 11, Suppl. 39, 47 - 52.)

Untersuchungen zur Pharmakodynamik des Motilins haben ergeben, daß es beim Hund die Durchblutung sowie die Pepsinsekretion des Magens stimuliert und die gastrale Motilität Aktiviert. Weiterhin wurde beschrieben, daß das Peptid den unteren Ösophagussphinkter kontrahiert und im Hungerzustand koordinierte, intermittierende Kontraktionen des Dünndarms auslöst. Bei der Ratte und beim Meerschweinchen konnten bisher keine Wirkungen des Motilins nachgewiesen werden, während beim Kaninchen eine kontraktionssteigernde Wirkung an der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Trakts zu beobachten war (Tabelle 2).

Tabelle 2 :

Wirkung von Motilin (13-Nle-Motilin) in Tieren

H u n d :

Pepsinsekretion	Zunahme	(1)
Magenschleimhautdurchblutung	Zunahme	(10)
Magenmotilität	Zunahme	(1)
Unterer Ösophagussphinkterdruck	Zunahme	(11)
Intermittierende Dünndarmkontraktionen	Einleitung	(9)

R a t t e und M e e r -		
s c h w e i n c h e n :	keine Wirkung	(12)
Kanin-		
chen	: Gastrointestinale	
	Motilität	Zunahme (12)

Auch beim Menschen konnte eine kontraktionssteigernde Wirkung des Motilins an isolierten Muskelpräparaten aus unterschiedlichen Regionen des Magen-Darm-Trakts sowie am unteren Ösophagussphinkter nachgewiesen werden. Wie beim Hund, wird auch beim Menschen die Pepsinsekretion des Magens durch Motilin gesteigert. Die Entleerung des Magens ist aber beim Menschen, im Gegensatz zu den zitierten Tierversuchen, nach Motilin nicht beschleunigt, sondern gehemmt. Als weitere Besonderheit ließ sich beim Menschen eine Hemmung der Proteinbiosynthese in der Magenschleimhaut nach Motilinapplikation nachweisen (Tabelle 3).

Tabelle 3 :

Wirkungen von Motilin (13-Nle-Motilin) am Menschen
(0,6 bis 2,4 pmol / kg / min iv.)

Magenentleerungsrate	Abnahme	(13)
Unterer Ösophagussphinkterdruck	Zunahme	(14)
Pepsinausschüttung im Magen	Zunahme	(13)
Proteinbiosynthese in der Magenschleimhaut	Abnahme	(17)

Das weite Spektrum der pharmakologischen Wirkungen des Motilins läßt vermuten, daß dieses Peptid an der physiologischen Steuerung der Magen-Darm-Funktion beteiligt ist. Allerdings ist bis heute nicht bekannt, unter welchen physiologischen Bedingungen es zu einer vermehrten

Motilinsekretion aus den Speicherzellen kommt. Die bisher vorliegenden Untersuchungen zur Motilinsekretion haben aber gezeigt, daß unter in vivo Bedingungen die intraduodenale Verabreichung von Fett (8) wie auch von Salzsäure (7) eine signifikant vermehrte Motilinfreisetzung induzieren. Des weiteren wurde von Dryburgh und Brown beim Hund eine vermehrte Motilinsekretion nach Alkalisierung des Duodenums beobachtet.

Diese in vivo Versuche lassen keine Aussage darüber zu, ob die genannten Substanzen die Motilinzelle direkt zu stimulieren vermögen, oder ob es sich um indirekte, möglicherweise nerval über vagale Reflexe gesteuerte Effekte handelt. Um den Mechanismus der Motilinfreisetzung zu erhellen, wurde daher in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, mit verschiedenen physiologischen und pharmakologischen Substanzen in einem in vitro Modell die Motilinfreisetzung zu stimulieren und ihre Kinetik quantitativ zu erfassen.

Als Versuchsobjekte dienten Mucosastückchen aus der Duodenalschleimhaut des Schweines. Dieses Versuchstier wurde gewählt, weil die heute bekannte Aminosäuresequenz des Motilins der Sequenz des Motilins des Schweines entspricht, und auch alle bisher bekannten radioimmunologischen Bestimmungsverfahren des Motilins auf dieser Peptidsequenz aufgebaut sind. Damit ist optimal gewährleistet, daß es unter den genannten Versuchsbedingungen ge-

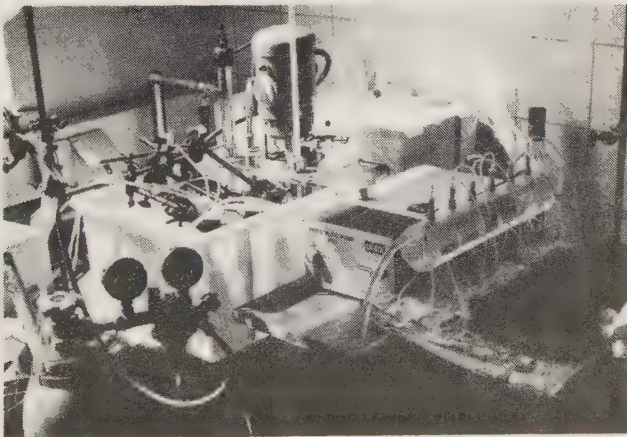
lingt, das Motilin rein zu erfassen.

Als Stimulatoren wurden verwendet : Salzsäure unterschiedlicher Konzentration, Natronlauge, Tris-hydroxymethyl - aminomethan , Natriumbikarbonat , Cholsäure verschiedener Konzentration , Äthylalkohol und Triglyceride ,in Pilot-Versuchen auch Pentagastrin , Acetylcholin , Noradrenalin und Cholecystokinin-Pankreozymin.

II. Versuchsbeschreibung

A. Versuchsaufbau

Bei den Versuchen war entscheidend, über die ganze Versuchsdauer möglichst konstante Bedingungen für die Mucosaproben zu schaffen, und die pro Zeiteinheit produzierte Motilinmenge laufend abzuleiten und zu bestimmen. Das folgende Foto zeigt die verwendete Versuchsanlage.

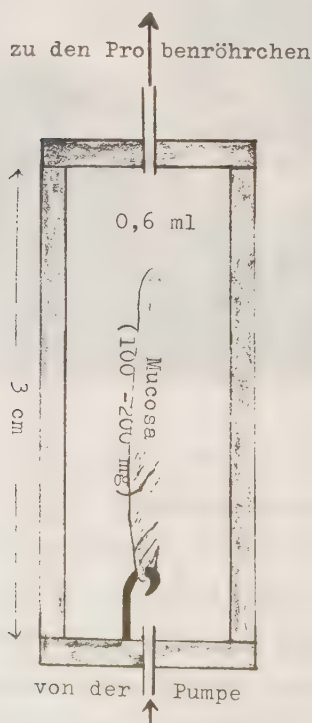


Hierauf erkennt man auf der linken Seite ein auf 38°C konstant aufheizbares Wasserbad, in dem sich die Vorratsgefäße mit den Perfusionsflüssigkeiten befinden. Aus diesen Gefäßen pumpt eine auf 0,5 ml/Min geeichte Rotationspumpe durch 6 gleich lange Schläuche 0,5 ml Earle's Nährlösung zu den 6 je 0,6 ml großen Versuchskammern, die sich wiederum in einem Plexiglasbehälter befinden, der von einer leistungsfähigen Pumpe mit Was-

ser aus dem 38°C warmen Wasserbad durchströmt wird.

Es gelang dabei das Schlauchvolumen vom Vorratsgefäß bis zur Versuchskammer mit den Mucosastückchen auf 0,27 ml zu begrenzen. Von den zylindrischen Kammern führen dünne Schläuche zu einer Abfüllvorrichtung, die es ermöglicht die 6 Versuchsgefäße jeweils gleich lange zu durchströmen und die Perfusionsflüssigkeit exakt zwei Minuten (= 1 ml) lang in die Probenröhrchen laufen zu lassen (Abb. 3).

Abb. 2
Versuchskammer



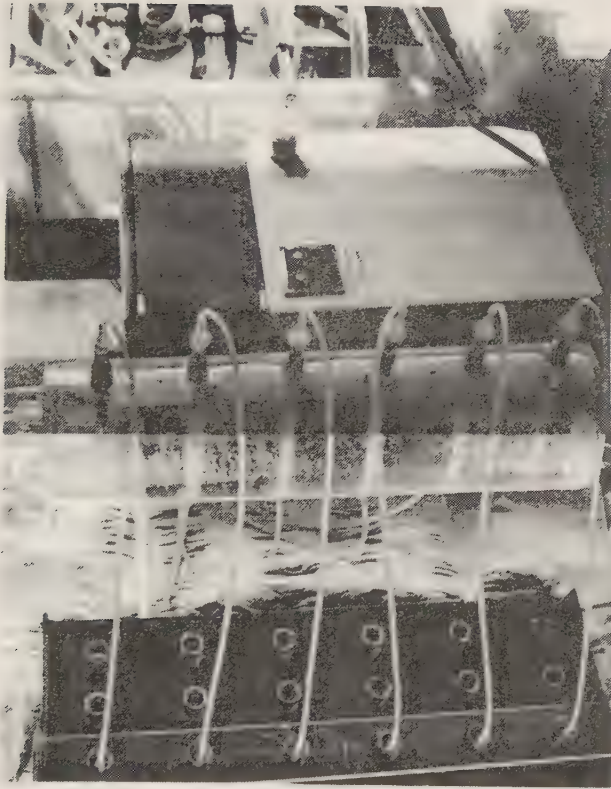


Abbildung 3

Das gesamte perfundierte Volumen (Strecke : Vorratsgefäß - Pumpe - Versuchskammer - Probenröhrchen) beträgt dabei 1,3 ml, abzüglich 0,1 - 0,2 ml für das Lucosavolumen. Das bedeutet, daß bei einer Auswechslung der Vorratsgefäße höchstens 2 Min 24 sec verstreichen (eine Durchmischung wird dabei vernachlässigt) , bis die neue Perfusionslösung ins Probenröhrchen tropft. Die Durchmischung ist tatsächlich vernachlässigbar klein, was Tests mit pH - Änderungen von 7,5 auf 1,0 zeigten,

- es war eine scharfe Trennung vorhanden.

Die Versuchskammern (Abb. 3) sind zylindrisch mit einer Grundfläche von $0,2 \text{ cm}^2$ und einer Höhe von ca. 3 cm. In diesen befindet sich eine Aufhängevorrichtung (Abb. 2), die es ermöglicht, Mucosastückchen am Boden zu befestigen. Die Durchströmungsrichtung der Kammern ist von unten nach oben.

Das Duodenumstück vom Schwein wird vor Versuchsbeginn in der begasten Nährlösung so präpariert, daß nur die innerste Schicht bis zur Lamina muscularis mucosae übrigbleibt , die dann weiter verwendet werden kann. Diese Schicht wird in dünne Längsstreifen von 100 - 200 mg Feuchtgewicht geschnitten, damit die Diffusionsstrecke unter 1 mm liegt, und die Zellen optimal ernährt werden können. Auch die Freisetzung - und Nachweiszeit für Motilin wird so bei Reizung auf einen Minimalwert herabgesetzt.

Nun noch einige Daten zur Nährlösung :

Es handelt sich um eine Earle's Lösung der Firma Serva Feinbiochemika GmbH & Co , der ein Bikarbonatpuffer (2200 mg / l) zugegeben wird, so daß ein pH von 7,4 - 7,6 erreicht wird. Zu dieser Lösung hat man noch je einen ml 1x100 konz. essentieller A.S. und nicht essentieller Aminosäuren der gleichen Firma gegeben.

Die Osmolarität beträgt ca. 320 mosmol.

Diese Lösung wurde während der Versuche mit Carbogengas (Gemisch aus 80 % Sauerstoff und 20 % Kohlendioxid) durchströmt.

B. Versuchsdurchführung

Nachdem die Schweinemucosastückchen präpariert und in die durchströmten Kammern gebracht sind, kann noch nicht mit der Messung begonnen werden, da sich noch Gewebe, das bei der Präparation zerstört wurde, in der Apparatur befindet und falsch positive Motilinfreisetzung vortäuschen kann. Erst nach ca. 20 Min. werden im Abstand von 10 Min. 3 Leerwerte (ohne Stimulation) abgefüllt. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug bei allen Versuchen 0,5 ml Nährlösung / Minute, und jedes Probenröhrchen wurde über zwei Minuten gefüllt. Nach jeder Abfüllung wird die Perfusionsflüssigkeit bis zur nächsten Sammlung im Probenröhrchen in ein Abfallbehältnis eingeleitet. Sobald die 3 Leerwerte gewonnen sind, wird versucht durch einen Reiz die Freisetzung von Motilin zu steigern. Als ersten Reiz haben wir dabei die bereits erfolgreich getestete Bolusstimulation mit Salzsäure angewendet. Man geht dabei so vor, daß die Pumpe für ca. 30 Sekunden angehalten wird, und in dieser Zeit in die Versuchskammern mit langen Injektionsnadeln, die bis auf den Boden reichen, 120 Mikroliter 0,2 normaler Salzsäure mit Injektionsspritzen eingepresst werden. Die Säure wandert bei geschickter Injektion als geschlossener Bolus längs der Kammer nach Einschaltung der Pumpe nach oben, und die Mucosazellen werden wieder optimal ernährt und stimuliert.

Wie vorherige Tests ergeben haben, gelangt die eingespritzte Säure innerhalb 25 - 45 Sekunden fast vollständig wieder aus der Kammer in die Abfüllröhrchen. Aber trotzdem ergeben sich infolge des Pumpenstops, der unterschiedlichen Injektionszeit und Bolusverdünnung und der nicht exakt abmessbaren Säuremenge große Unterschiede, so daß diese Methode der Bolusstimulation

ziemlich ungenau ist und keinen Anspruch auf genaue quantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse zuläßt.

Sofort nachdem die Proben abgefüllt sind, müssen die Röhrchen tiefgefroren werden, denn sonst kann das Motilin, das ein Peptidhormon ist, leicht zerfallen, und die Ergebnisse sind weniger charakteristisch. Erst zur Bestimmung (Doppelbestimmung) mit Hilfe eines spezifischen Radioimmunoassays werden sie wieder aufgetaut.

C. Radioimmunoassay

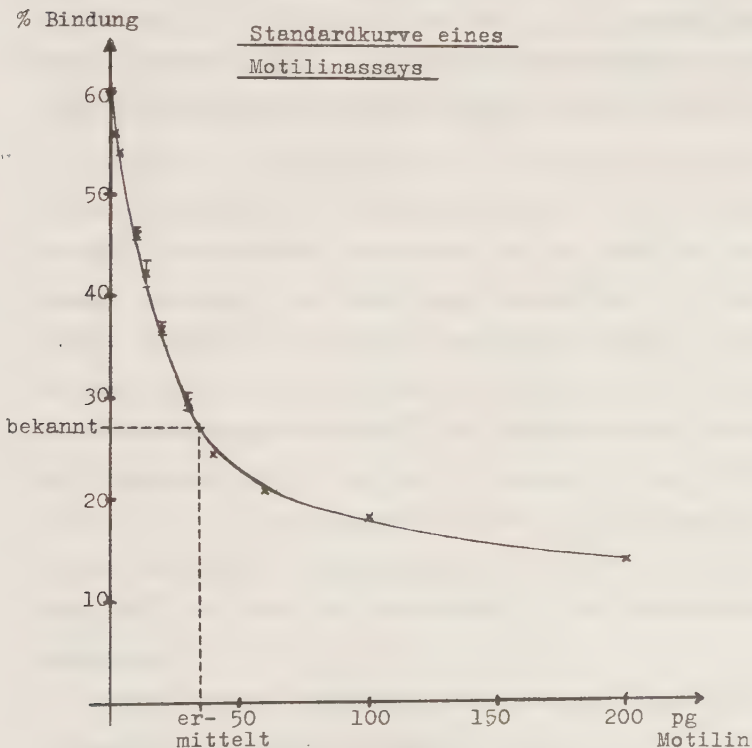
Bei dieser Methode wird die zu bestimmende Probenmenge in Veronalpuffer (PH 8) gelöst und dann nach Hinzufügung von Label und Antikörper gut durchmischt und für zwei Tage zur Inkubation in den Kühlraum gestellt. Im Label ist ein mit J^{125} markiertes Motilin (Antigen) vorhanden. Der Antikörper ist aus Kaninchenserum gewonnen.

Während der Inkubationszeit bindet sich sowohl markiertes als auch unmarkiertes (aus der Probe stammendes) Motilin an die Antikörper. Zwischen markiertem und jodlosem Motilin stellt sich ein Gleichgewicht ein. Ob mehr markiertes Motilin vom Antikörper gebunden wird hängt von der Motilinkonzentration in der Probe ab.

Wird nun Aktivkohle, die in Veronalpuffer, zu dem Pferdeplasma gegeben wurde, aufgeschwemmt ist, hinzugegeben und dann das Ganze zentrifugiert, so bleibt der Antigen - Antikörperkomplex im Überstand, und nur ungebundenes Motilin sedimentiert im Zentrifugat. Der Überstand wird nun vom Abgesetzten getrennt,

und beide Teile können einzeln im Gamma - Counter hinsichtlich ihrer Aktivität geprüft werden. War nun viel Motilin in der zu bestimmenden Probe, so hat er viel mit J^{125} markiertes Motilin des Labels daran gehindert sich mit Antikörpern zu verbinden, und viel J^{125} des Labels gelangt ins Zentrifugat. Es sind also nur wenige Prozent des markierten Hormons im Überstand zurückgeblieben. War dagegen fast kein Motilin in der Probe, so ist sehr viel markiertes Hormon an Antikörper gebunden und nach der Zentrifugation im Überstand vorhanden. Ein hoher Prozentsatz ist also gebunden.

Abb. 4



Wird nun mit Hilfe von ansteigenden bekannten Motilinmengen eine Standardkurve (Abb. 4) erstellt, bei der als Abszisse die bekannten Motilinmengen und als Ordinate die dazugehörigen ermittelten Bindungsprozente aufgetragen werden, so kann man aus dem resultierenden Graphen bei bekannten Bindungsprozenten (umgerechnete Ergebnisse des Gamma - Counters) durch Lotungen die gesuchte Hormonmenge entnehmen. (Siehe Abb. 4)

Auf obiger Zeichnung ist eine von vielen Standardkurven zu sehen, die man erstellen mußte, um die Assays auswerten zu können. Die Kurve zeigt in ihrem unteren Teil Hyperbelform, und man erkennt leicht, daß bei Werten über 100 pg Motilin große Ablesefehler auftreten können. Deshalb haben wir versucht immer im oberen, empfindlicheren Graphenteil zu messen.

III. Ergebnisse und Diskussion

A. Stimulationsversuche

1. Salzsäure

a) Bolusstimulation

Diese Versuche sollten zeigen, daß ~~dem~~ Säurebolusreiz auch in vitro eine erhöhte Motilinfreisetzung folgt. Bei der Durchführung wurden nach Abfüllung von drei Werten ohne Reiz (-20 , -10 , 0 Min.) nach Pumpenstop möglichst schnell und gleichzeitig in jede der Versuchskammern 120 Mikroliter einer 0,2 normalen Salzsäurelösung gespritzt. Die Osmolarität liegt dabei kurzfristig zwischen zwei Grenzwerten : 400 mosmol (keine Durchmischung vorausgesetzt) und 336 mosmol (vollständige Durchmischung unterstellt). Diese Schwankung sollten die Mucosazellen unbeschadet überstehen. Der pH - Wert in der Kammer verändert sich dabei sehr unterschiedlich. Kurzzeitig schwankt er innerhalb des Bolus zwischen 1 und 3. Entscheidend ist die Durchmischung mit der Earle's-Lösung, die von der Einspritzstelle, dem Einspritzdruck, der Einspritzgeschwindigkeit und der Strömungsrichtung (Wirbelbildung ...) in der Kammer abhängt. Diese Tatsachen erklären die enorme Schwankungsbreite der Motilinfreisetzung, die auch noch von Individuum zu Individuum unterschiedlich ist.

Die statistische Absicherung eines stimulierbaren Anstiegs der Motilinfreisetzung erfolgt mit Hilfe des Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (Sachs, Lothar. Statistische Auswertungsmethoden. 1970. Springer Verlag. Kapi-

tel 422). Dabei werden die Differenzen zwischen den Werten bei Stimulation und denen vor der Reizung (Basalwerte) gebildet. Anschließend vergibt man Rangzahlen entsprechend dem Absolutbetrag der Differenzen, und die Summe der Rangzahlen, deren Differenz einen negativen Wert hat, wird als Prüfgröße W ermittelt und mit der kritischen Größe (aus der Tabelle) abgewogen.

Es folgen die Versuchsergebnisse in pg Motilin pro Minute und 100 mg Mucosafeuchtwicht mit der statistischen Berechnung :

Tabelle 4 :

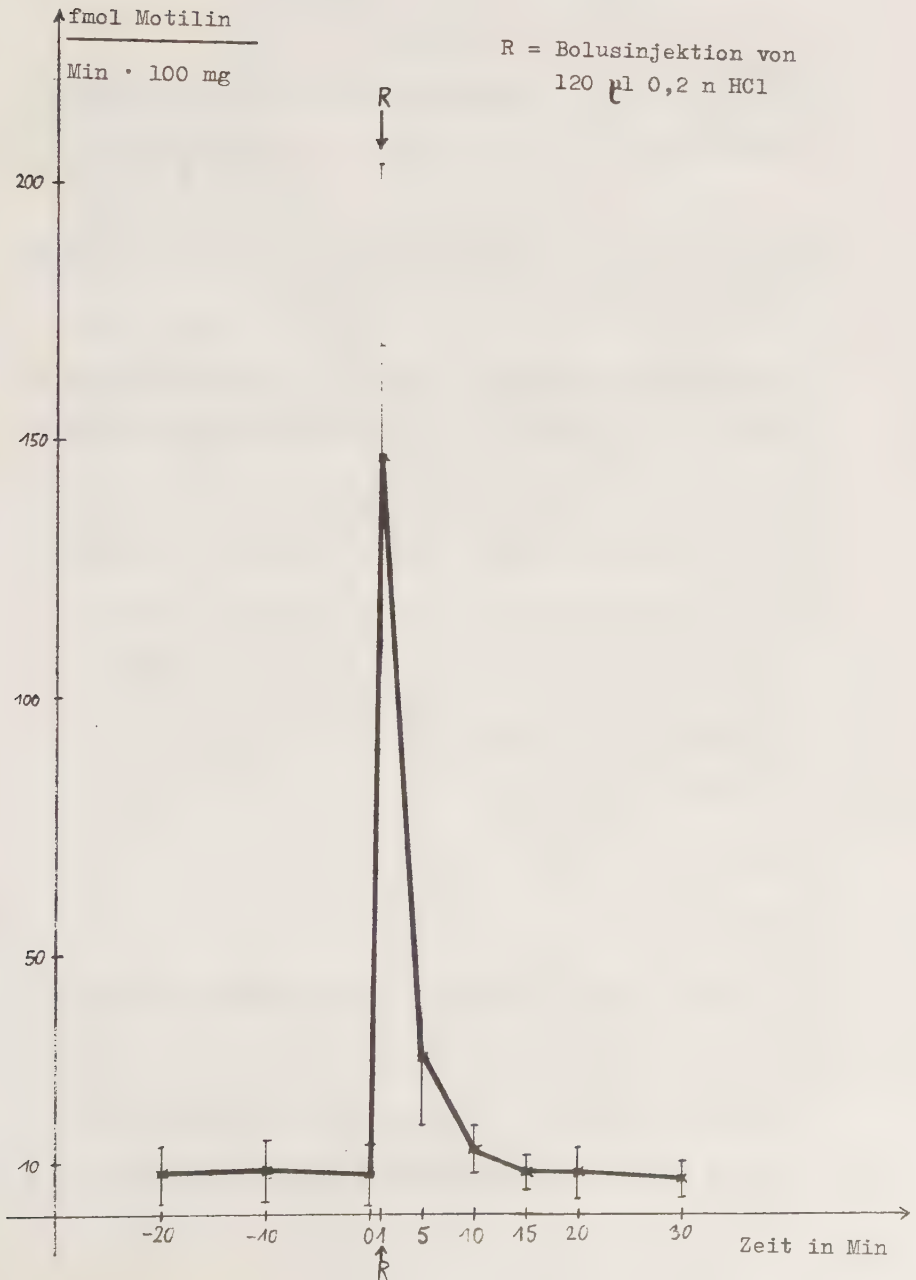
Wert bei 1 Min	Basalwert	Differenz	Rangzahl
X_{11}	X_{12}	$= d_i$	R
250	3	247	+ 2
374	5	369	+ 5
650	54	596	+ 9
331	29	302	+ 4
650	33	617	+ 10
262	20	242	+ 1
318	26	292	+ 3
550	26	524	+ 8
771	14	757	+ 11
509	51	458	+ 7
378	8	370	+ 6

Nullhypothese $H_0 : \tilde{\mu} = 0$ $\tilde{\mu}$ = Medianwert der Grundgesamtheit

Gegenhypothese $H_1 : \tilde{\mu} > 0$

HCl - Bolusstimulation

(Mittelwert und Standardabweichung
aus 11 Versuchen)



Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 66$

" " negativen " : $R_n = 0$

Prüfgröße $W = 0$

Krit. Größe $= 0$

für $\alpha = 0,1 \%$

Hieraus folgt : H_0 ist bei einer Irr-

tumswahrscheinlichkeit

von $0,1 \%$ zu verwerfen.

Die Gegenhypothese besagt nun, daß ein Anstieg der Motilin-freisetzung auf Säurereiz stattfindet.

Das Testergebnis bestätigt, was man aus dem Kurvenverlauf entnehmen kann, nämlich daß dem Salzsäurebolusreiz prompt eine vermehrte Motilinfreisetzung folgt. Im Mittel beträgt sie bei den Versuchen $147 \text{ fmol pro Minute}$ und pro $100 \text{ mg Mucosafeuchtgewicht}$. Dies ist etwa der 20 - fache Wert der basalen Sekretion, die im Mittel bei 7 fmol Mo-tilin liegt. Dem sehr raschen Anstieg der Motilinkonzentration folgt ein etwas langsamerer Abfall in der Freisetzung. Nach 15 Minuten ist praktisch der basale Wert wieder erreicht.

Diskussion :

Aus diesem ersten Versuch läßt sich entnehmen, daß einem Salzsäurebolusreiz eine stark vermehrte Motilinfreisetzung folgt. Ob das ein aktiver Prozess ist, oder ob die Säure das Motilin aus seinen Speichern physikalisch oder chemisch löst, läßt sich anhand dieses Ergebnisses nicht klären.

Versuche, die an anderer Stelle veröffentlicht werden, lassen vermuten, daß die erhöhte Motilinkonzentration nicht von durch die Säureeinwirkung zerstörten und geplatzten Zellen stammt. Wir haben nämlich von einigen Probenreihen die Kaliumionenkonzentration bestimmt und dabei keine erhöhten Konzentrationen für K^+ -ionen während der Säurestimulation gefunden. Da die Kaliumionenkonzentration intrazellulär 140 mval beträgt, hätte eine Zellzerstörung einen K^+ - Konzentrationsanstieg (in der Earle's-Nährlösung sind nur 5,4 mval K^+ / l) zur Folge haben müssen. Aus diesem Grund kann ein Motilinanstieg aufgrund eines Zellzerfalls ausgeschlossen werden.

b) Stimulation mit verschiedenen
festen pH - Werten

Um quantitative Aussagen über die Motilinfreisetzung bei Säurereiz machen zu können, wurden Stimulationen mit Nährlösungen durchgeführt, die durch Salzsäurezugabe auf die drei pH -Werte 1,5 , 2,5 und 3,5 gebracht wurden. Die Reizdauer mit den drei konstant eingestellten pH-Werten betrug jeweils 15 Minuten.

Wichtig bei der pH-Messung war dabei, daß die Bestimmung erst nach Aufheizung auf 38°C und nach längerer Begasung mit Carbogengas, das zu einer beträchtlichen Absenkung des pH-Wertes führt, stattfand. Trotzdem erhöhten sich die Wasserstoffionenkonzentrationen während der Versuche noch etwas. Die Versuchsdurchführung war ähnlich der bei Bolusinjektion.

Die folgende Tabelle 5 enthält die freigesetzten Motilinsmengen in pg pro Minute und pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht in der Anordnung für den Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben mit Hilfe des H-Tests von Kruskal und Wallis (vergleiche Sachs, Lothar. Statistische Auswertungsmethoden). Dabei werden für die um die mittleren Basalwerte verringerten Mittelwerte bei konstanter pH-Reizung Rangzahlen vergeben. Es wird geprüft, ob die drei Gruppen (pH 1,5 , pH 2,5 und pH 3,5) aus Grundgesamtheiten mit gleicher Verteilung der Anstiege vom mittleren Basalwert (5 , 10 , 15 Min.) stammen (Nullhypothese), oder verschiedenen Grundgesamtheiten angehören, zwischen denen Unterschiede in den Anstiegen vorhanden sind (Gegenhypothese).

Tabelle 5

Mittelwert - Basalwert = Differenz Rangzahl

P H = 3 , 5

51	49	2	+ 1
74	38	41	+3
112	10	102	+ 5
60	8	52	+ 4
217	13	204	+10
228	12	216	+12
33	3	30	+ 2
			R ₁ =37

$$R_1^2/n_1 = 195,6$$

P H = 2 , 5

307	30	277	+14
308	21	287	+15
202	22	180	+ 9
234	23	211	+11
143	9	134	+ 7
161	10	151	+ 8
111	6	105	+ 6
250	3	247	+13
			R ₂ = 83

$$R_2^2/n_2 = 861,1$$

P H = 1 , 5

683	29	654	+17
615	28	587	+16
1810	8	1802	+21
1777	11	1766	+19
1700	1	1699	+18
1800	5	1795	+20
			R ₃ =111

$$R_3^2/n_3 = 2053,5$$

$$\text{Prüfgröße } H = \left(\frac{12}{21(21+1)} \right) (195,6 + 861,1 + 2053,5) - 3(21+1) =$$

$$H = 80,8 - 66 = \underline{\underline{14,8}}$$

$$\text{Kritische Größe } \chi^2_{2, 0,001} = 13,82 < 14,8 = H$$

Daß eine Erhöhung der Motilinfreisetzung stattfand, zeigt der beim Bolusversuch eingesetzte Wilcoxon - Test für Paardifferenzen. In allen Fällen beträgt die Prüfgröße 0 (Summe der negativen Rangzahlen). Man findet für den Stimulationswert

PH Fallzahl mit

3,5 7 1% Irrtumswahrscheinlichkeit

2,5 8 1% "

1,5 6 5% "

einen Anstieg der Hormonfreisetzung gegenüber den Basalwerten.

Abbildung 6

fmol Motilin

Min · 100 mg

Stimulation durch Änderung

des pH-Wertes der

Perfusionslösung

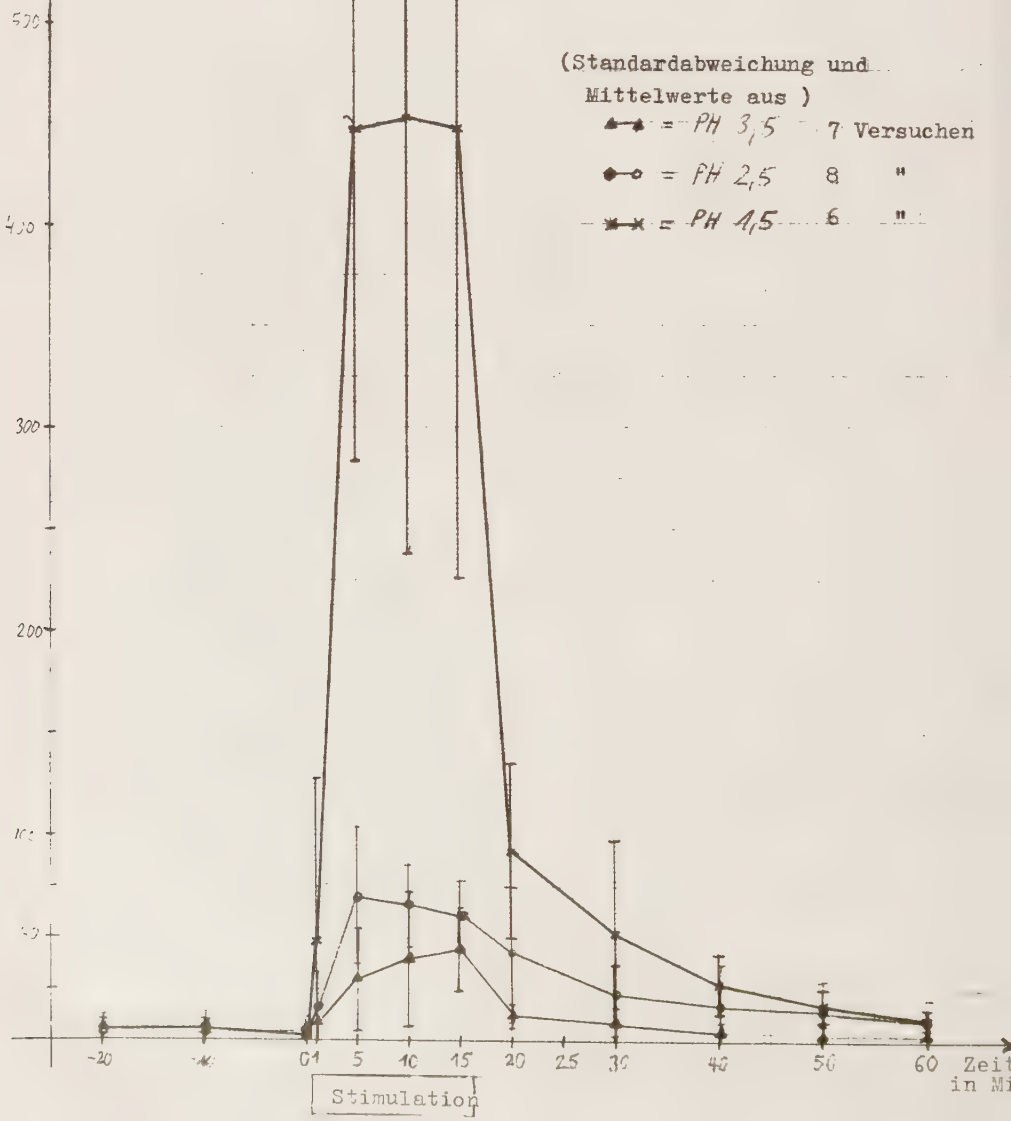
(Standardabweichung und

Mittelwerte aus)

▲▲ = PH 3,5 7 Versuchen

●○ = PH 2,5 8 "

✖✖ = PH 1,5 6 "



Somit ist mit 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit nicht anzunehmen, daß diedrei Stichprobengruppen einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen.

Für alle drei Paarvergleiche zwischen den Gruppen ergeben sich auf dem 5 % Niveau Unterschiede in den Anstiegen der Motilinkonzentration gegenüber den Ausgangswerten. Die Basalwerte der drei Gruppen sind ungefähr gleich. (Nach Statistische Methoden von Lothar Sachs, 2. Auflage 1970 , Springer Verlag)

In Abbildung 6 ist für verschiedene pH-Werte der Nährlösung gezeichnet, wie sich die freigesetzte Motilinkonzentration ändert.

Bei pH 3,5 wird nur eine geringe Erhöhung der Hormonmenge gegenüber den Basalwerten beobachtet. Sie läßt sich aber mit dem oben durchgeführten Wilcoxon - Test statistisch auf dem 1 % Niveau sichern.

Die bei pH 2,5 gegenüber pH 3,5 vermehrt gemessene Motilinmenge ist in Abbildung 6 zu sehen und rechnerisch mit dem H-Test von Kruskal und Wallis und Paarvergleich nach Lothar Sachs zu belegen.

Der zwischen pH 2,5 und 1,5 erneute Anstieg der Motilinfreisetzung ist sehr groß und offensichtlich , wie es auch der H-Test und der anschließende Paarvergleich bestätigt.

Es läßt sich also im gemessenen pH - Bereich sagen : Die Motilinfreisetzung ist umso größer , je größer die Wasserstoffionenkonzentration in der Nährlösung ist.

Diskussion :

Nachdem es mit der Säurebolusinjektion schon gelang, eine Freisetzungssteigerung gegenüber dem Basalwert zu zeigen, ist die pH - Abhängigkeit der Motilinfreisetzungsmenge im obigen Versuch klar herausgestellt worden.

Interessant wäre natürlich zu wissen, ob es sich bei dem Motilinkonzentrationsanstieg um einen aktiven Prozeß handelt. Um dies zu untersuchen, könnte man sich die Temperaturabhängigkeit aktiver Vorgänge zunutze machen . Bei tiefen Temperaturen (4°C) sollten alle energieabhängigen Ereignisse langsamer und mit verminderter Leistung ablaufen.

Dies wurde ausgenutzt und der Stimulationsversuch einmal bei 4°C eingeleitet, und während des Versuchs eine Temperaturanhebung auf 37°C vorgenommen, ein anderes Mal wurde er mit umgekehrten Temperaturen durchgeführt. Leider hat sich herausgestellt, daß bei Beginn mit 4°C eine Erhöhung der Hormonfreisetzung bei 37°C ausblieb. Testversuche mit zwei mal 37°C zeigten beim zweiten Mal einen großen Abfall, der auf die lange Versuchsdauer zurückzuführen ist. Beim umgekehrten Vorgehen (Start mit 37°C dann 4°C) war auch kein Erfolg zu erkennen, denn die Kontrollen (zwei mal 37°C) wiesen ja auch einen viel geringeren Anstieg beim zweiten Mal auf. Vergleiche zwischen Versuchen bei 4°C und 37°C brachten wegen der individuellen Streuung ebenfalls kein brauchbares Ergebnis.

Die Motilinfreisetzung scheint also nicht temperaturabhängig zu sein. Dies ist sinnvoll, denn beim Genuß von größeren Mengen kalter Speisen und Getränke müßten dann Störungen des interdigestiven Komplexes auftreten, der ja, wie in der Einleitung beschrieben, vom Motilin initiiert wird, was von der Natur sicher nicht gewünscht wird.

Den Beweis für einen aktiven Vorgang müssen also andere Untersuchungen erbringen. Oder wie sich später zeigte : Temperaturversuche bei Stimulation mit Cholsäure (längere Stimulationszeiten möglich) , diese Untersuchungen wurden aber nicht mehr ausgeführt.

2. Reizung mit Laugen

a) Natronlauge

Nachdem auf Salzsäurereiz, die ja physiologischerweise im Magen und Bulbus duodeni vorkommt, eine vermehrte Motilinkonzentration antwortet, interessierte, was passiert, wenn man Lauge injiziert. Mit Natriumbikarbonat, dessen HCO_3^- - Anion schwach basisch reagiert, wird nämlich die Salzsäure im Dünndarm wieder neutralisiert.

Es wurde wie bei Säurebolusstimulation verfahren. Man injizierte anstelle von Salzsäure 120 Mikroliter 0,2 normaler Natronlauge. Das Ergebnis, es handelt sich wieder um eine Freisetzung, ist auf Abbildung 7 zu sehen. Anschließend folgt in Tabelle 6 die Auflistung der freigesetzten Motilinnengen in pg Motilin pro Minute und pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht. Der Nachweis eines Anstiegs nach Laugengabe wird mit dem schon verwendeten Wilcoxon-Test für Paardifferenzen geführt.

Tabelle 6 a

Wert nach 1 Min	- Basalwert	= Differenz	Rangzahl
X_{i1}	- X_{i2}	= d_i	R
363	25	338	+ 6
650	41	609	+ 10
500	18	482	+ 7
560	24	536	+ 8
153	4	149	+ 5
668	94	574	+ 9
58	42	16	+ 1
122	40	82	+ 4
40	8	32	+ 3
40	12	28	+ 2

Abbildung 7

NaOH - Bolusstimulation

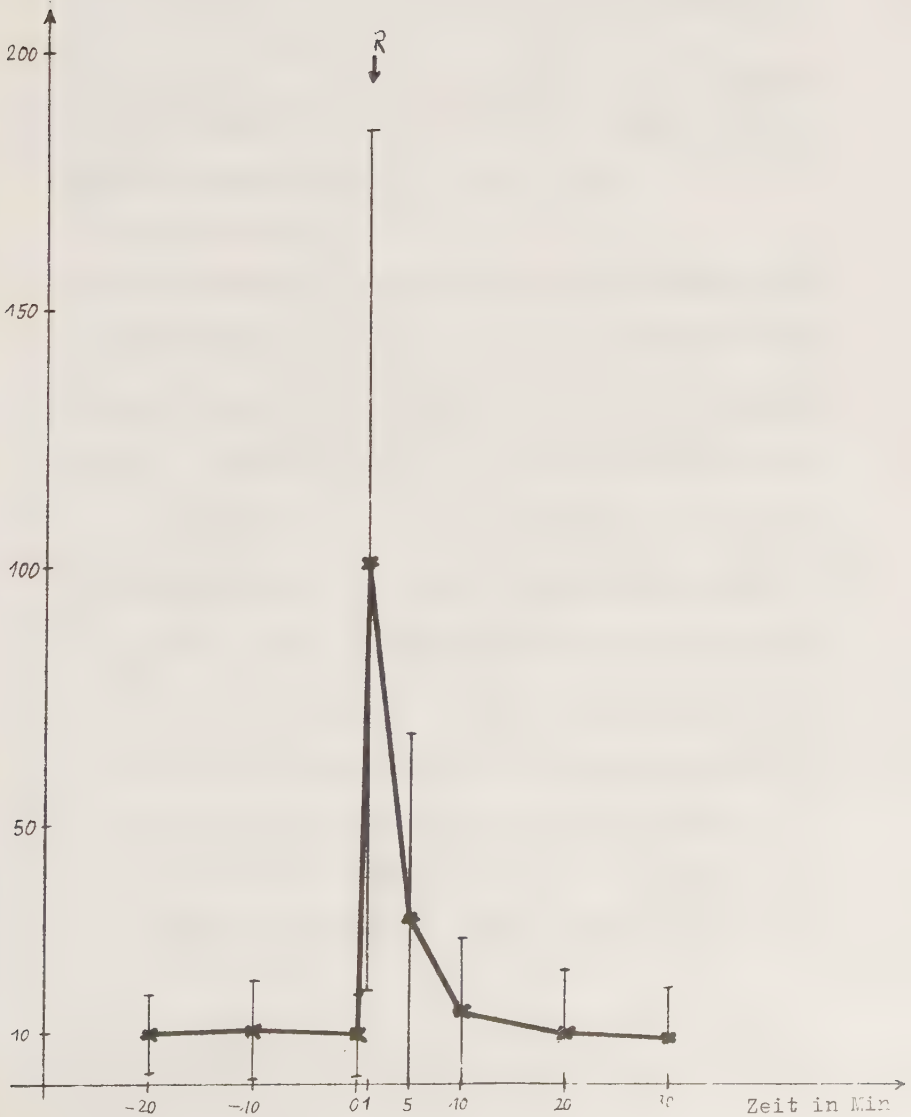
(Mittelwert und Standardabweichung
aus zehn Versuchen)

fmol Motilin

Min .100 mg

R = Bolusinjektion von

120 μ l 0,2 n NaOH



Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 55$

" " negativen " : $R_n = 0$

Nullhypothese : $H_0 : \tilde{\mu} = 0$

Gegenhypothese : $H_1 : \tilde{\mu} > 0$

$\tilde{\mu}$ = Medianwert der
Grundgesamtheit

Prüfgröße $W = 0$

Kritische Größe = 3

für $\alpha = 1\%$

Hieraus folgt : H_0 ist bei einer
Irrtumswahrschein-
lichkeit von 1 %
zu verwerfen.

Die Gegenhypothese besagt nun, daß ein Anstieg der Hormonfreisetzungsmenge auf Natronlaugenreiz hin stattfindet, der bei den Messungen im Mittel 100 fmol Motilin pro Minute und pro 100 mg Mucosa beträgt, das ist etwa das 10fache des Basalwertes. (Siehe Abbildung 7) Dieser Wert ist zwar nicht so groß wie beim Säurebolus (20fach), aber immer noch sehr auffällig.

Der Abfall nach dem Spitzenwert bei einer Minute ist ähnlich rasch wie beim Säureversuch. Nach 15 Minuten ist der basale wieder erreicht. Das ist sehr verständlich, denn es handelt sich in beiden Fällen ja um einen kurzzeitigen Reiz, der sehr schnell nachläßt, da die im Gewebe verbliebenen Wasserstoffionen rasch vom Bikarbonatpuffer der Earle's - Nährlösung neutralisiert werden.

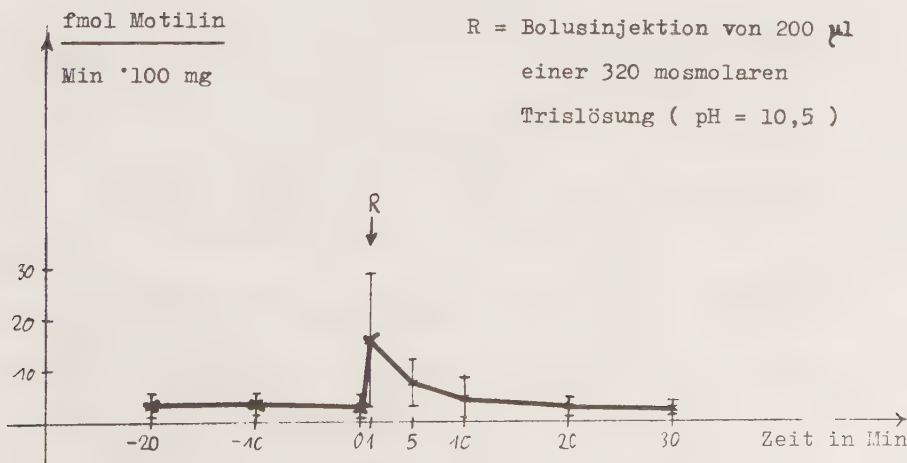
b) Stimulation mit Tris -
- (Hydroxymethyl) aminomethan

Bei der Entdeckung des Motilins wurde zur Freisetzung Tris - Puffer benutzt. Es erscheint deshalb sinnvoll, an Schweinemucosa auch diesen Stoff zu testen. Zu diesem Zweck wurde ein Bolus von 200 Mikroliter einer 320 mosmolaren Tris - Lösung , die einen pH - Wert von 10,5 besitzt , in die Versuchskammern injiziert. Die Folge war eine mäßige Erhöhung der Hormonfreisetzung, die in Abbildung 8 zu sehen ist.

Abbildung 8

Tris - Bolusstimulation

(Mittelwerte und Standardabweichungen
 aus 9 Versuchen)



Dieser Anstieg wird erneut mit dem Wilcoxon - Test belegt.

In Tabelle 7 sind die Motilinnengen (in pg / Min und pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht) bei Reizung und die Basalwerte zusammengestellt.

Tabelle 7 :

Wert nach 1 Min	- Basalwert	= Differenz	Rangzahl
X_{i1}	- X_{i2}	= d_i	R
145	9	136	+ 9
60	19	41	+ 8
59	21	38	+ 6
6	8	- 2	- 1
50	15	35	+ 5
28	5	23	+ 3,5
28	8	20	+ 2
43	3	40	+ 7
26	3	23	+ 3,5

Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 44$

" " negativen " : $R_n = 1$

Nullhypothese : $H_0 : \tilde{\mu} = 0$

Gegenhypothese : $H_1 : \tilde{\mu} > 0$

$\tilde{\mu}$ = Medianwert der Grundgesamtheit

Prüfgröße $W = 1$

Kritische Größe = 1

für $\alpha = 1 \%$

Hieraus folgt : H_0 ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % zu verwerfen.

Die Gegenhypothese besagt, daß ein Anstieg der Hormonfreisetzungsmenge auf Tris - (Hydroxymethyl) amino-

methanreiz hin stattfindet, der bei den Messungen im Mittel 16 fmol Motilin / Min und pro 100 mg Mucosafeuchtwicht erreicht, das ist ungefähr das 4fache des Basalwertes (Siehe Abbildung 8). Der Abfall gegenüber dem Natronlaugenanstieg (10fach) erklärt sich aus dem niedrigeren pH - Wert des Tris-Puffers (10,5).

c) Bolusstimulation mit
Natriumbikarbonat

Die im Magen produzierte Salzsäure wird im Dünndarm mit Pankreassekret neutralisiert . Bauchspeicheldrüsenflüssigkeit enthält dazu Natriumbikarbonat, das durch Sekretin in seiner Konzentration beeinflußt (+) wird. Mit einem letzten Laugenversuch soll gezeigt werden, daß auch das Natriumhydrogenkarbonat des Pankreassekrets in der Lage ist, vermehrt Motilin freizusetzen.

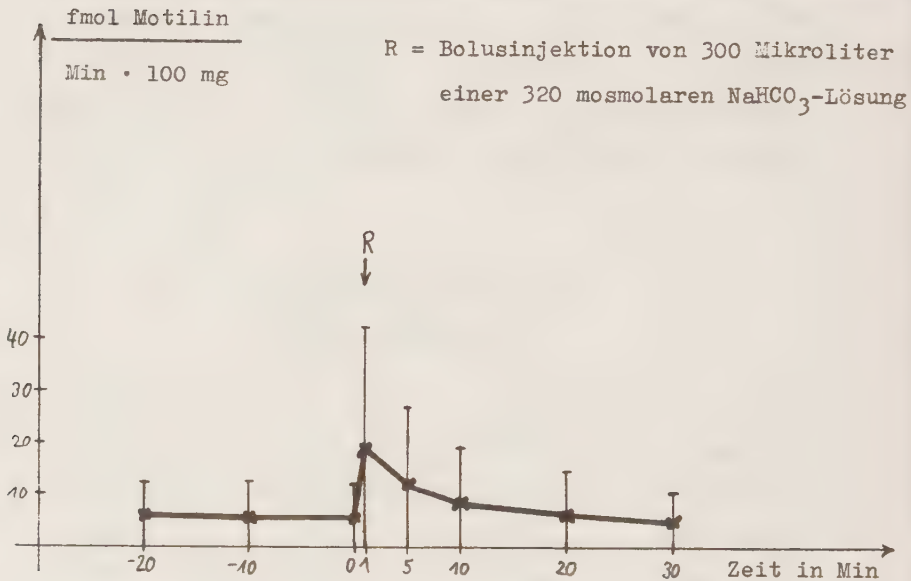
Hierzu benutzt man wieder die Bolusinjektion. Diesmal wurden 300 Mikroliter einer 320 mosmolaren Natriumbikarbonatlösung in die Versuchskammern mit der Mucosa gebracht. Es folgte, wie schon bei den anderen beiden Versuchen vorher, ein Anstieg der Hormonkonzentration. Dieser fiel aber wahrscheinlich wegen des geringen pH-Wertes (9,5) nur niedrig aus, und die Bereiche Mittelwert - , Mittelwert + Standardabweichung überschneiden sich ganz beträchtlich (Siehe Abbildung 9).

Zur statistischen Sicherung eines Anstiegs der Motilinkonzentration nach Bikarbonatreiz wird wieder ein Wilcoxon-Test für Paardifferenzen durchgeführt. Dazu sind in Tabelle 8 die Hormonmengen in pg Motilin / Min und 100 mg

Abbildung 9

NaHCO₃ - Bolusstimulation

(Mittelwert und Standardabweichung aus 8 Versuchen)



Mucosafeuchtgewicht vor und nach der Reizung zusammengestellt.

Tabelle 8 :

Wert nach 1 Min	-	Basalwert	=	Differenz	Rangzahl
X_{i1}	-	X_{i2}	=	d_i	R
14		11		3	+ 2
9		11		- 2	- 1
206		56		150	+ 8
128		44		84	+ 7
18		5		13	+ 3
39		3		36	+ 6
20		4		16	+ 4
37		5		32	+ 5

Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 35$

" " negativen " : $R_n = 1$

Nullhypothese H_0 : $\tilde{\mu} = 0$

Gegenhypothese H_1 : $\tilde{\mu} > 0$

$\tilde{\mu}$ = Medianwert der Grundgesamtheit

Prüfgröße $W = 1$

Kritische Größe = 3

für $\alpha = 5\%$

Hieraus folgt : H_0 ist bei einer

Irrtumswahrschein-

lichkeit von 5 %

zu verwerfen.

Die Gegenhypothese besagt, daß ein Anstieg der Hormonfreisetzungsmenge auf Natriumhydrogenkarbonatreiz hin stattfindet, der im Mittel 19 fmol Motilin pro Minute und pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht beträgt, das ist das 3 - bis 4Fache des Basalwertes (Siehe Abbildung 9). Das Kurvenbild entspricht dem der anderen Bolusstimulationen mit schnellem Anstieg und etwas langsameren Abfall.

Diskussion :

Alle drei Laugenstimulationen haben eindeutig gezeigt, daß auf Hydroxidionenreiz hin eine vermehrte Motilinfreisetzung antwortet. Es ist dabei gleich von welchem Stoff die OH^- -Ionen stammen, entscheidend ist wahrscheinlich deren Konzentration, ähnlich wie beim Säurereiz.

Die Hydroxidionenkonzentration spiegelt sich dabei im pH - Wert wieder. Je höher der pH - Wert (OH^- - Ionenkonzentration) , desto größer scheint die freigesetzte Hormonmenge. Genau lagen die Mittelwerte bei Stimulation mit :

Mikroliter	Stoff	pH - Wert	bei	fmol Motilin
300	NaHCO_3	9,5		19
200	Tris-Puffer	10,5		16
120	NaOH	13		100

Quantitative Vergleiche sollten aber wegen der oben beschriebenen Ungenauigkeiten der Bolusreize nicht weiter angestellt werden. Versuche mit mehreren verschiedenen konstanten pH-Werten der Nährlösung zwischen pH 10 und 14 sollten allerdings eine pH-Abhängigkeit der Motilin-freisetzung in diesem Bereich , ähnlich der im sauren Milieu, beweisen.

3. Stimulation mit Cholsäure

a) Entdeckung der Cholsäure als Stimulator

Bis jetzt hatten wir herausgefunden, daß Säuren und Laugen die Motilinfreisetzung beeinflussen. Es lag nahe zu vermuten, daß andere Stoffgruppen, die auch im Darm vorkommen, eventuell ebenfalls eine Wirkung auf die Motilinkonzentration haben. Man ist versucht, zuerst an Fettsäuren zu denken, die auch Wasserstoffionen abgeben und Hydroxidgruppen besitzen.

Bei der Austestung wurde auch eine Kammer als Leerwert mit nur Earle's und Cholsäure, die als Lösungsvermittler für Triglyceride diente, perfundiert. Zur Überraschung sah man schon bei der Zählratenbestimmung im Gamma - Counter, daß Cholsäure allein eine Wirkung auf die Motilinfreisetzung hat. Die zur Perfusion verwendete Earle's - Lösung enthielt dabei nur 10 mmol Cholsäure pro Liter mit einem fast nicht veränderten pH - Wert von 7,6 .

Diese Cholsäurekonzentration ist nicht hoch, denn im Dünndarm setzt die Micellenbildung erst oberhalb einer Konzentration von 5mmol pro Liter ein. Gleichzeitig erschien mit der Cholsäurestimulation eine Plateauphase, die Hemmversuche ermöglicht, leicht zu erreichen, denn auch nach längerer Zeit war noch kein Abfall der erhöhten Motilinmenge zu bemerken, wie es leider bei den Säurestimulationen der Fall war.

b) Reizung mit verschiedenen
Cholsäurekonzentrationen

Nachdem Cholsäure als Stimulator für Motilin feststand, wollten wir wissen, ob eine Konzentrationsabhängigkeit der Hormonfreisetzung gegenüber dem Micellenbildner besteht. Drei Konzentrationen wurden ausgewählt : 15,5 , 31,0 und 62,0 mmol Cholsäure pro Liter Nährlösung. Die nachfolgende Konzentration ist dabei genau das Doppelte der Vorausgegangenen.

Bei der Versuchsdurchführung wurden drei Leerwerte (-20 , -10 , 0 Min) abgefüllt, und dann die Versuchskammern für je 25 Minuten mit Earle's - Nährlösung perfundiert , die die oben genannten festen Cholsäurekonzentrationen enthielten . Danach wurden die Mucosazellen wieder mit Earle's ohne Stimulator ernährt und davon noch einige Proben abgefüllt, um den Abfall der Motilinmenge zum Basalwert zu beobachten.

Das Resultat ist in Abbildung 10 zu sehen. Sofort nach Beginn der Perfusion mit Cholsäure steigt die Hormonkonzentration an. Die Werte streuen erheblich, was zum Teil auf die unterschiedlichen Zeitunterschiede zwischen Versuchsdurchführung und Bestimmung des Motilingehalts der abgefüllten Proben mit dem Radioimmunoassay zurückzuführen ist. Der statistische Nachweis eines Anstiegs wird erneut mit dem Wilcoxon - Test für Paardifferenzen (Siehe Tabelle 9) geführt. Die Konzentrationsabhängigkeit des Anstiegs wird mit dem H - Test von Kruskal und Wallis untersucht.

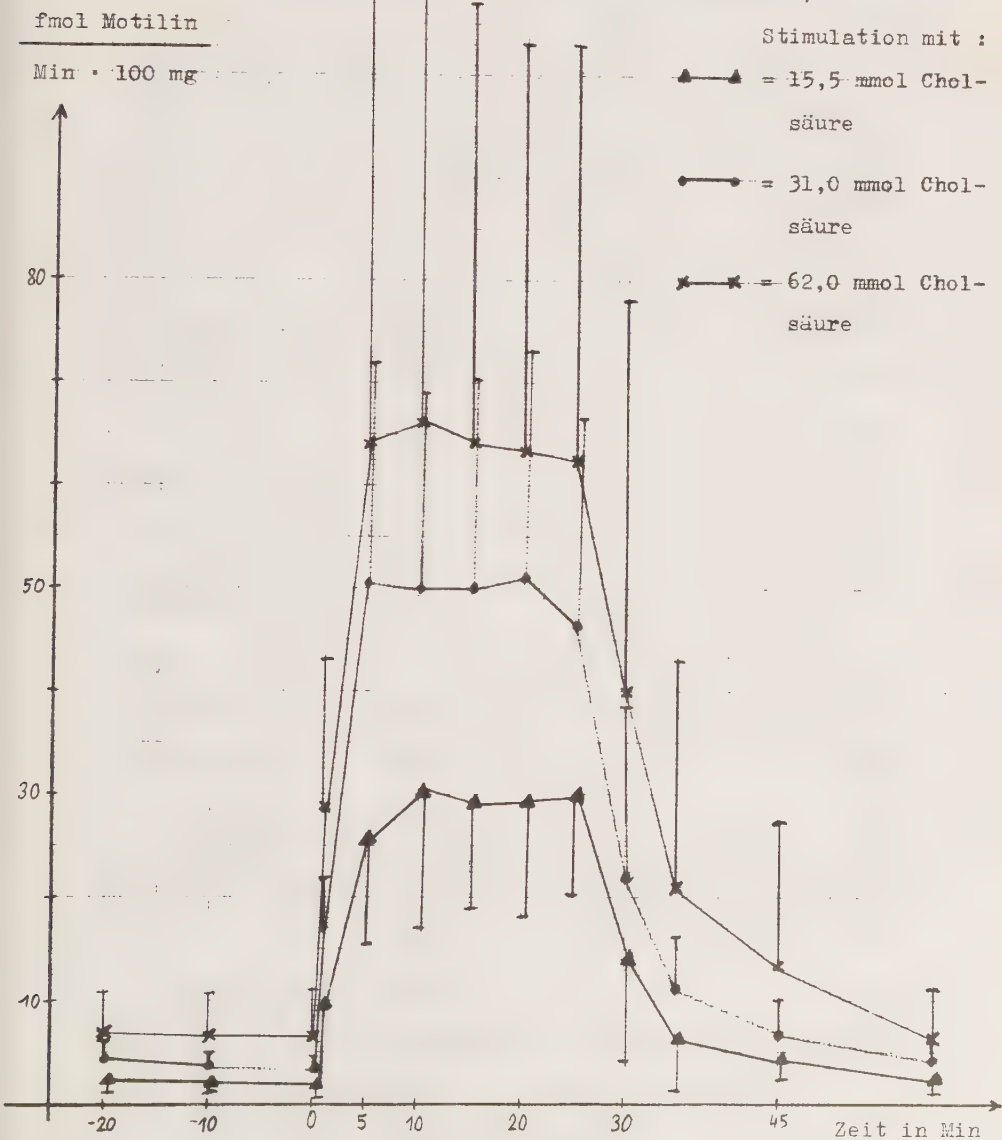
Abbildung 10

Stimulation durch verschiedene Cholsäu-

rekonzentrationen in der Perfusionslösung

(Mittelwerte und Standardabweichung aus je

10 Versuchen)



Stimulation

Tabelle 9 :

Mittelwert bei

Stimulation - Basalwert = Differenz Rangzahl

X_{i1} - X_{i2} = d_i R

15,5 mmol Cholsäure

96	4	92	+	13
124	6	118	+	16
107	4	103	+	14
149	10	139	+	19
112	5	107	+	15
86	8	78	+	11
53	10	43	+	3
56	6	50	+	5
37	5	32	+	1
81	17	64	+	8

31,0 mmol Cholsäure

257	5	252	+	27
232	20	212	+	25
155	7	148	+	20
138	9	129	+	18
209	4	205	+	24
171	16	155	+	22
126	7	119	+	17
80	9	71	+	9
90	11	79	+	12
79	17	62	+	7

Fortsetzung der Tabelle 9 :

X_{i1}	-	X_{i2}	=	d_i	R
62,0 mmol Cholsäure					
395		7		388	+ 30
378		28		350	+ 29
192		5		187	+ 23
190		41		149	+ 21
283		14		269	+ 28
269		43		226	+ 26
94		17		77	+ 10
69		24		45	+ 4
71		10		61	+ 6
57		17		40	+ 2

Wilcoxon - Test

Benützt werden die Differenzen (d_i) jeweils einer Gruppe aus der Tabelle 9. Die Stimulation mit den Konzentrationen ergibt :

für 15,5 mmol Cholsäure

Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 55$

" " negativen " : $R_n = 0 = W$

für 31,0 mmol Cholsäure

Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 55$

" " negativen " : $R_n = 0 = W$

für 62,0 mmol Cholsäure

Summe der positiven Rangzahlen : $R_p = 55$

" " negativen " : $R_n = 0 = W$

Nullhypothese : $H_0 : \tilde{\mu} = 0$

Gegenhypothese : $H_1 : \tilde{\mu} > 0$

$\tilde{\mu}$ = Medianwert der Grundgesamtheit

In allen drei Fällen gilt :

Prüfgröße $W \neq 0$

Kritische Größe = 3 Hieraus folgt : H_0 ist bei einer
Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %
zu verwerfen.

Die Gegenhypothese besagt, daß ein statistisch signifikanter Anstieg der Motilinkonzentration für alle drei Cholsäurekonzentrationen nachgewiesen ist.

Aus Abbildung 10 läßt sich entnehmen, daß im Mittel die größte Menge Motilin für die höchste Cholsäurekonzentration freigesetzt wird. Es gilt nun mit dem H - Test von Kruskal und Wallis zu untersuchen, ob trotz der großen Streuung der Werte (große Standardabweichung) ein signifikanter Anstieg zwischen den Gruppen vorhanden ist.

H - Test von Kruskal und Wallis

Es wird geprüft, ob die drei Gruppen (15,5 , 31,0 und 62,0 mmol Cholsäure pro Liter) aus Grundgesamtheiten

mit gleicher Verteilung der Anstiege vom mittleren Basalwert (-20 , -10 , 0 Min) auf den Mittelwert bei Stimulation (5 , 10 , 15 , 20 , 25 Min) stammen (Nullhypothese) , oder verschiedenen Grundgesamtheiten angehören, zwischen denen Unterschiede in den Anstiegen vorhanden sind(Gegenhypothese) .

Die zu ermittelnde Prüfgröße H ist asymptotisch chi-quadratverteilt mit zwei Freiheitsgraden (drei Gruppen).

Unter der Nullhypothese ist die Prüfgröße H :

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \cdot \left(\sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(n+1)$$

mit $n = 30$ und $k = 3$

Für 15,5 mmol Cholsäure ergibt sich :

$$\text{Summe der Rangzahlen : } R_1 = 105 \quad \frac{R_1^2}{n_1} = 1102,5$$

Für 31,0 mmol Cholsäure beträgt :

$$\text{Summe der Rangzahlen : } R_2 = 181 \quad \frac{R_2^2}{n_2} = 3276,1$$

Für 62,0 mmol Cholsäure ergibt sich :

$$\text{Summe der Rangzahlen : } R_3 = 179 \quad \frac{R_3^2}{n_3} = 3204,1$$

$$\sum_{i=1}^{k=3} \frac{R_i^2}{n_i} = 7582,7$$

$$\text{Prüfgröße } H = \left(\frac{12}{30(30+1)} \right) (7582,7) - 3(30+1) =$$

$$H = 97,84 - 93$$

$$H = 4,84$$

$$\text{Kritische GröÙe : } \chi^2_{2, 0,05} = 5,99 > 4,84 = H$$

Die Nullhypothese, die drei Gruppen stammen aus Grundgesamtheiten mit gleicher Verteilung der Anstiege, läßt sich daher mit unseren Werten nicht ablehnen.

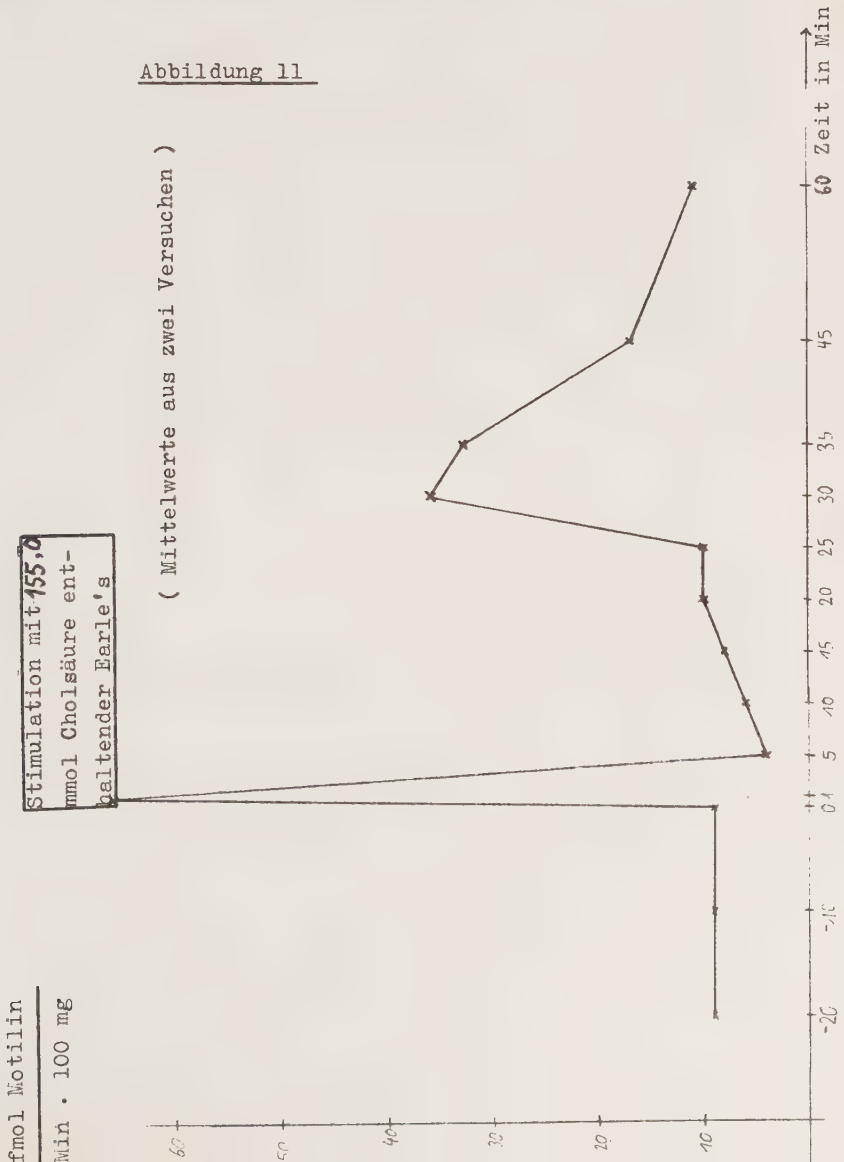
Das Versuchsergebnis, daß für Reize zwischen 31,0 und 62,0 mmol Cholsäure / l nicht bei allen Mucosaproben ein Anstieg in der Motilinfreisetzung zustande kommt, wird im nachfolgenden Versuch zum Cholsäurereizoptimum erklärt und begründet. (Zwischen 40 und 60 mmol Cholsäure / l wird nämlich nicht mehr Motilin bei steigender Reizstoffkonzentration freigesetzt, sondern es kommt im Gegenteil für sehr große (größer 60 mmol) Cholsäurekonzentrationen bei vielen Individuen bereits wieder zu einer Verminderung der Hormonsekretion. Dies war aber bei der Planung dieses Versuches noch nicht bekannt, und so konnten die Reizstoffkonzentrationen nicht optimal gewählt werden.)

c) Versuche mit hoher

Cholsäurekonzentration

Nach dem letzten Ergebnis sahen wir uns veranlaßt Stimulationen mit noch höherer Cholsäurekonzentration zu versuchen. Das Resultat zeigt Abbildung 11 .

Abbildung 11



Nachdem drei basale Proben, die im Mittel 9 fmol Motilin pro Minute und pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht enthielten, abgefüllt wurden, wird mit 155 mmol Cholsäure enthaltender Earle's, die dazu 1 : 1 mit 310 mosmolarer Cholsäurelösung verdünnt wird, perfundiert.

Die Hormonfreisetzungsmenge steigt daraufhin wie erwartet schnell an, fällt aber danach sofort so steil, wie es bisher noch nie der Fall war, ab auf einen Wert, der zum Teil sogar unterhalb der Basalkonzentration liegt. Während die Stimulation andauert, pendeln sich die Motilinwerte langsam wieder auf den Basalwert ein, um dann nach Beendigung der Reizung (Perfusion wieder mit normaler Nährlösung ohne Cholsäure) sehr steil anzusteigen. Von einem zweiten Gipfelwert findet dann im Laufe der Zeit ein monotoner Abfall zur Grundkonzentration statt.

Diskussion :

Dieses Phänomen läßt sich folgendermaßen erklären :

Die Motilinfreisetzung bei Cholsäurereizung besitzt für einen bestimmten, individuell unterschiedlichen Konzentrationswert (zwischen 40 und 60 mmol Cholsäure / Liter) ein Maximum, oberhalb dieser Cholsäurekonzentration findet ein Abfall statt, der für sehr hohe Cholsäuremengen sogar in eine Motilinfreisetzungshemmung umschlägt.

Wird die Versuchskammer mit Cholsäure der Konzentration

155 mmol / Liter perfundiert, so ist diese Konzentration nicht sofort an den zu reizenden Zellen vorhanden, sondern wird erst allmählich im Laufe von einigen Minuten erreicht. Die Konzentration^{en} von 0 bis 155 mmol Cholsäure pro Liter werden dabei ähnlich einer Sauerstoffsättigungskurve durchlaufen. So ist es verständlich, daß in der Fraktion von 0 - 2 Minuten nach Reizbeginn noch eine große Menge Motilin freigesetzt wurde, während nach 5 Minuten, da jetzt schon die hohe Cholsäurekonzentration auf die Zellen wirkt, eine Hemmwirkung mit niedrigen Motilinwerten registriert wird. Der langsame Motilinanstieg während der Reizung kann ein Gewöhnungseffekt sein.

Wird nun umgekehrt die Reizung beendet, so ist nicht plötzlich die Konzentration 0 mmol Cholsäure / Liter im Mucosagewebe vorhanden, sondern die Konzentrationen von 155 nach 0 mmol / Liter werden im Sinne einer Hyperbel langsam durchlaufen. Dies erklärt den raschen Anstieg der Motilinmenge zum Wert 5 Minuten nach Stimulationsende. Zu diesem Zeitpunkt liegt die Reizstoffkonzentration an den Zellen sicher wieder im Bereich unterhalb des Optimalwertes von ca. 40 bis 60 mmol Cholsäure / Liter. Auch der träge Abfall zum Basalwert wird mit dem langsamen Absinken der Cholsäurekonzentration im Gewebe erklärt.

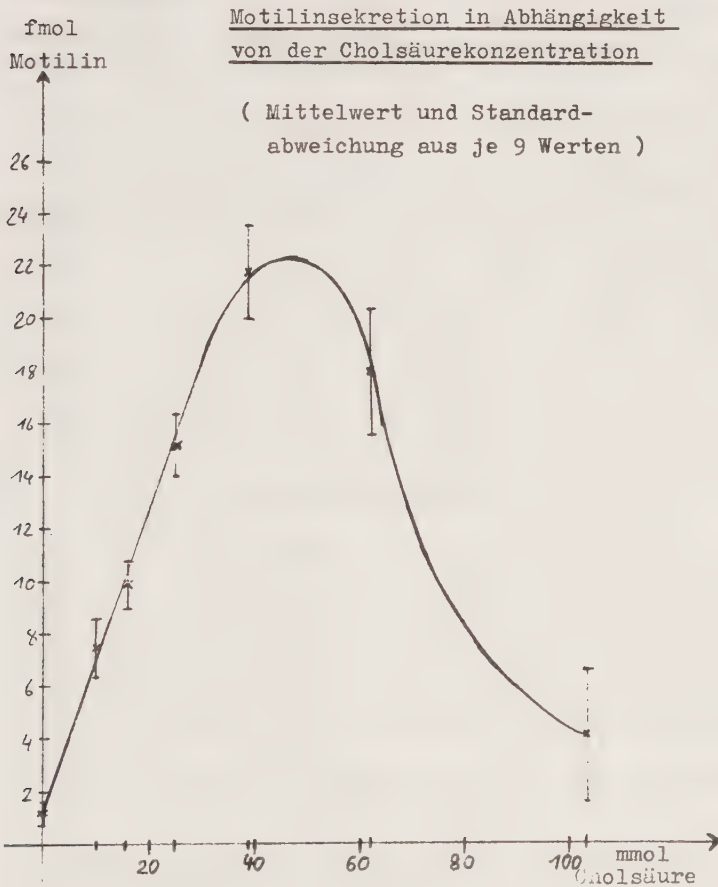
d) Versuch zum Cholsäurereizoptimum

Um das oben bereits erwähnte Cholsäurereizoptimum näher zu untersuchen, werden weitere Versuche mit 6 verschiedenen Cholsäurekonzentrationen in der Earle's - Nährlösung durchgeführt. Da man behaupten könnte, die Verdünnung (1 : 1) sei für den letzten Versuchsausgang mitbestimmend gewesen (die Ernährung des Gewebes während der Stimulation mit verdünnter Earle's sei nicht mehr ausreichend), gingen wir dazu über, die Reizkonzentration durch Hinzufügung höher konzentrierter Cholsäurelösung (310 mmol pro Liter) zur Earle's herzustellen. Der geringe Anstieg der Osmolarität spielt dabei keine Rolle, denn Versuche mit noch größeren Osmolaritäten (durch Kochsalz hergestellt) zeigten keinen Einfluß auf die freigesetzte Motilinkonzentration.

Bei der Versuchsdurchführung wurde besonderer Wert auf gleiche Verhältnisse gelegt. Die Mucosastückchen mußten vom gleichen Schwein und gleichen Duodenalabschnitt sein und möglichst gleiches Gewicht haben. Während der langen Reizzeit von 45 Minuten sollten genau alle 5 Minuten Proben abgefüllt, und die gesamten Motilinkonzentrationen in einem Radioimmunoassay bestimmt werden. (Wegen des zeitlichen Abfalls der Motilinkonzentration trotz Tiefrierens) So war es möglich ein gutes Ergebnis zu erzielen und in einer Kurve die Hormonkonzentration gegen die Reizstoffkonzentration aufzutragen (Siehe Abbildung 12). Wegen der optimalen Versuchsplanung ergeben sich nur kleine Standardabweichungen, und man erkennt unterhalb von 40 mmol Cholsäure pro Liter einen fast linearen An-

stieg der freigesetzten Motilinkonzentration. Zwischen 20 und 30 mmol Reizstoff pro Liter wird dann der vorher in der Theorie schon geforderte Maximalwert erreicht. Noch höhere Cholsäurekonzentrationen bringen wieder einen Abfall der Motilinkonzentration.

Abbildung 12



In der folgenden Tabelle 10 , die die Werte der Abbildung 12 enthält, sind die Motilinkonzentrationen für eine Minute nach Reizbeginn weggelassen, da zu diesem Zeitpunkt, wie oben bereits beschrieben wurde, an den Zellen noch nicht die volle Cholsäurekonzentration erreicht ist.

Tabelle 10 :

Messwerte in pg Motilin / Min • 100 mg Mucosa

Gruppennummer :	1	2	3	4	5	6	7
Konzentrationen der Cholsäure in mmol/l	: 0	10	15,5	24,8	38,76	62	103,34

Zeit in Min

5	3	19	27	51	60	58	14
10	3	18	31	43	61	62	13
15	2	20	30	40	66	52	33
20	4	25	31	47	65	64	8
25	6	22	30	48	72	62	11
30	5	25	31	47	72	60	8
35	4	26	33	47	66	54	8
40	4	26	26	51	76	43	8
45	4	28	36	51	72	49	11

Mittelwerte :	3,9	23,2	30,6	47,2	67,8	56,0	12,7
Standard- abweichung :	1,2	3,6	2,9	3,8	5,5	7,0	7,9

Werte in fmol Motilin / Min • 100 mg Mucosa

Mittelwerte :	1,2	7,5	9,8	15,2	21,8	18,0	4,1
Standardabweichung:	0,5	1,2	0,9	1,2	1,8	2,3	2,5

In der folgenden Tabelle 11 wird näher angegeben, ob anhand der Differenz der Mittelwerte eine Aussage über Anstieg oder Abfall der Motilinsekretion bei Reizung mit bestimmten Cholsäurekonzentrationen zu machen ist. Da der Messfehler je Wert bei etwa 5 pg Motilin liegt, sind manche Tendenzen, die deshalb nicht so aussagekräftig sind, in Klammern gesetzt.

Tabelle 11 :

Zu verglei- chende Gruppen	Unterschied der Mittelwerte	Konzentrationen der Cholsäure (A - B)	Tendenz

Vergleich des Basalwertes mit stimulierten Werten			
1 mit 2	19,3	0 - 10	Anstieg
1 mit 3	26,7	0 - 15,5	Anstieg
1 mit 4	43,3	0 - 24,8	Anstieg
1 mit 5	63,9	0 - 38,76	Anstieg
1 mit 6	52,1	0 - 62,0	Anstieg
1 mit 7	8,8	0 - 103,34	(Anstieg)

Zum Kurvenverlauf

1 mit 2	19,3	0 - 10	Anstieg
2 mit 3	7,4	10 - 15,5	(Anstieg)
3 mit 4	16,6	15,5 - 24,8	Anstieg
4 mit 5	20,6	24,8 - 38,76	Anstieg
5 mit 6	- 11,8	38,76 - 62,0	<u>Abfall</u>
6 mit 7	- 43,3	62,0 - 103,34	<u>Abfall</u>

Aus Tabelle 11 geht eindeutig hervor, daß nach Stimulation mit Cholsäure ein deutlicher Anstieg der Motilin-

freisetzung gegenüber dem Basalwert (Gruppe 1) zu beobachten ist. Eine Ausnahme bildet der Wert mit der höchsten Reizstoffkonzentration (103,34 mmol Cholsäure / l), bei dem schon fast wieder der Grundwert (ohne Stimulation) erreicht ist.

Zum Kurvenverlauf ist noch festzustellen : (Siehe auch Abbildung 12) Zwischen dem Basalwert und der kleinsten Cholsäurekonzentration (10mmol / Liter) zur Stimulation ist ein Anstieg der Motilinkonzentration vorhanden. Von 10 nach 15,5 mmol Cholsäure pro Liter ist trotz der kleinen Konzentrationsdifferenz noch ein Anstieg der Hormonkonzentration errechenbar. Die etwas größere Reizstoffkonzentrationsdifferenz von 15,5 nach 24,8 mmol / l hat wieder einen großen Anstieg der Motilinsekretion zur Folge. Zwischen 24,8 und 38,76 mmol Cholsäure / Liter berechnet man erneut einen Motilinanstieg.

Im Intervall von 38,76 nach 62 mmol / l tritt nun ein Abfall der freigesetzten Hormonkonzentration auf. Die erneute Steigerung der Cholsäurekonzentration auf 103,34 mmol / l hat nochmals einen sehr deutlichen Abfall der Motilinausschüttung zur Folge. Dieser Abfall ist so groß, daß sich die mit 103,34 mmol Cholsäure / Liter zu erreichende Motilinnmenge nur noch gering vom Basalwert (ohne Stimulation) unterscheidet.

Aus den oben beschriebenen Anstiegen und Abfällen läßt sich klar schließen, daß zwischen 40 und 60 mmol Cholsäure / Liter ein Maximum an Motilin freisetzbar ist.

Denkt man sich den Kurvenverlauf nach höheren Reizkonzentrationen hin verlängert (Abbildung 12) und erin-

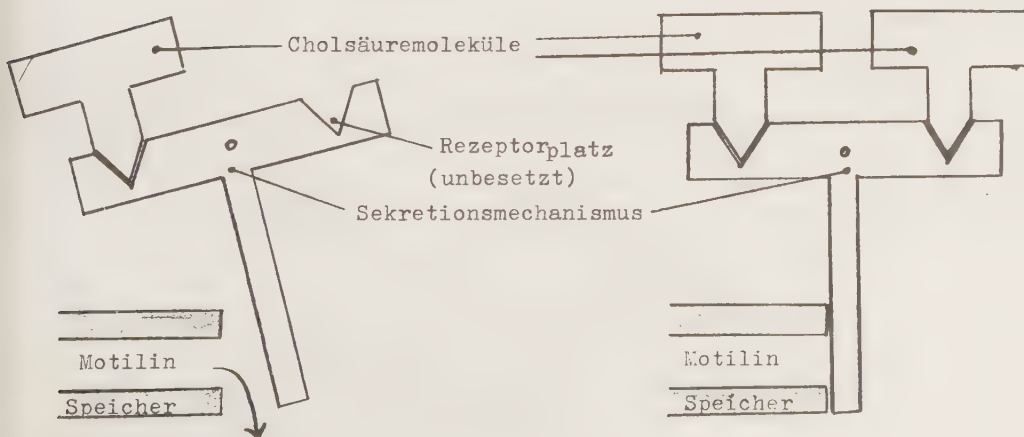
nert sich noch an Abbildung 11 (Reizung mit 155 mmol Cholsäure / l) zurück, so wird ersichtlich, daß für größere Reizstoffkonzentrationen keine Stimulation der Motilinausschüttung mehr erfolgt.

Diskussion :

Der Kurvenverlauf von Abbildung 12 gibt einen weiteren Hinweis darauf, daß der Motilinfreisetzung ein aktiver Prozeß zugrunde liegt. Wäre es nämlich ein passiver Vorgang, eine physikalische oder chemische Herauslösung des Motilins so dürfte für vermehrte Reizkonzentration kein Abfall stattfinden, sondern eher eine weitere Erhöhung der Motilinkonzentration. Eine aktive Sekretion des Motilins dagegen kann durch eine Hemmung herabgesetzt werden.

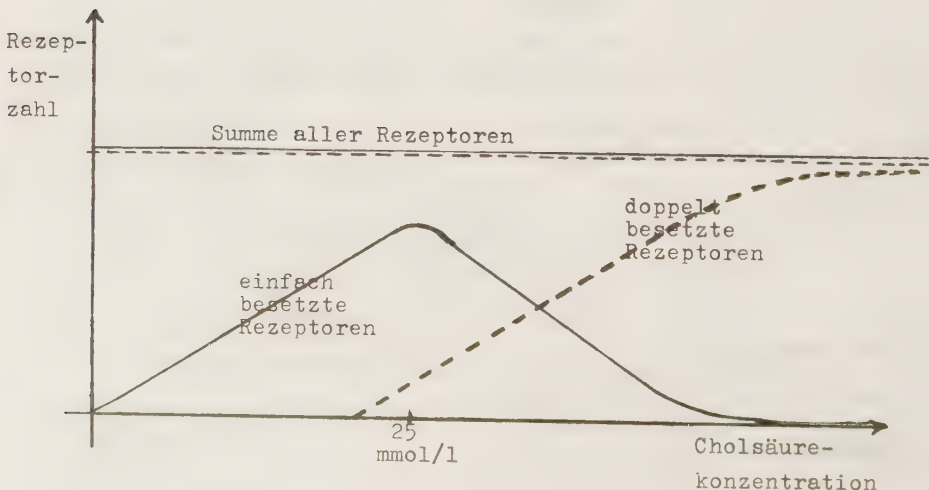
Die Tatsache, daß durch niedrige Cholsäurekonzentrationen vermehrt Motilin ausgeschüttet wird, während hohe Reizstoffkonzentrationen diese Sekretion wieder verringern, läßt sich durch folgende Modellvorstellung erklären :

Schema 1



Man kann sich vorstellen, daß ein Sekretionsmechanismus existiert, der zwei Bindungsstellen für Cholsäuremoleküle besitzt. Wird eine Bindungsstelle besetzt, so kann zum Beispiel die Struktur eines Polipeptids so verändert werden, daß dadurch eine vergrößerte Membranlücke entsteht, wodurch eine im Innern aufgebaute Motilinkonzentration sezerniert wird. Durch die Besetzung der einen Bindungsstelle kann es für ein zweites Cholsäuremolekül etwas schwerer werden, den benachbarten Rezeptorplatz einzunehmen (z. B. durch sterische Gründe - Siehe dazu Schema 1). Werden nun bei noch höherer Cholsäurekonzentration auch die zweiten Bindungsstellen zunehmend besetzt (Siehe Schema 2) , so kann es abermals durch eine Veränderung in der Tertiär - oder Quartärstruktur des gleichen oder eines anderen Makromoleküls geschehen, daß die vorher geöffnete Membranlücke wieder geschlossen wird, und dadurch die Sekretion insgesamt abnimmt.

Schema 2



Dieses Modell ist sehr gut in der Lage den linearen Anstieg (immer mehr Rezeptoren werden einfach mit Cholsäuremolekülen besetzt, worauf immer mehr Motilin sezerniert wird), das Maximum der Motilinausschüttung (Maximum einfach besetzter Rezeptoren) und den darauffolgenden Abfall in der Motilinsekretion (Anstieg doppelt besetzter Rezeptoren) für ansteigende Cholsäurekonzentrationen zu erklären.

Auch eine doppelte Rezeptorbindungsstelle eines Transmittermoleküls für Motilin durch die Zellmembran würde die oben aufgeführten Versuchsergebnisse erklären, wenn der Transmitter durch ein gebundenes Cholsäuremolekül aktiviert wird, während ein zweites gebundenes Molekül der gleichen Säure eine Inaktivierung des Transporteurs bedingt.

4) Stimulation mit Äthylalkohol

Bei der Testung von Gliadin auf stimulierende Wirkung für Motilin wurde 70 % - iger Alkohol als Lösungsmittel verwendet. Während der Durchführung des Versuches, bei der wieder die Bolusinjektion benutzt wurde, wurden 0,6 Milliliter 70 - prozentigen Äthylalkohols als Kontrolle ebenfalls in eine der Versuchskammern injiziert. Das Ergebnis war überraschend, denn sowohl von dem Mucosastückchen, das mit Gliadin und Alkohol als Lösungsmittel (1 g Gliadin in 10 ml 70 - prozentigen Äthanol gelöst und davon 0,6 ml injiziert) gereizt wurde, als auch von dem Dünndarmgewebe, das nur mit Äthanol stimuliert wurde, konnte in den zur Reizzeit abgefüllten Probenröhrchen eine erhöht freigesetzte Motilinkonzentration bestimmt werden.

Da sich die ausgeschütteten Hormonmengen nicht wesentlich unterscheiden, ist klar, daß Äthylalkohol als neuer Motilinstimulator feststeht. Auch eine zweimalige Wiederholung des Versuchs brachte dasselbe Ergebnis.

Die folgende Abbildung 13 zeigt den zeitlichen Ablauf, der aus vier Versuchen mit Äthanolbolusstimulation gewonnen ist. Es fand in allen vier Fällen ein deutlicher Anstieg der Motilinsekretion statt (Siehe Tabelle 12). Da die Werte stark streuen, ergibt sich für den Motilinwert bei einer Minute eine große Standardabweichung. Für den im Mittel bereits niedrigeren Hormonwert bei 5 Minuten läßt sich jedoch ein auf dem 5 % Niveau mit dem t - Test für paarige Stichproben zu belegender Anstieg

gegenüber dem Basalwert verzeichnen.

Abbildung 13 :

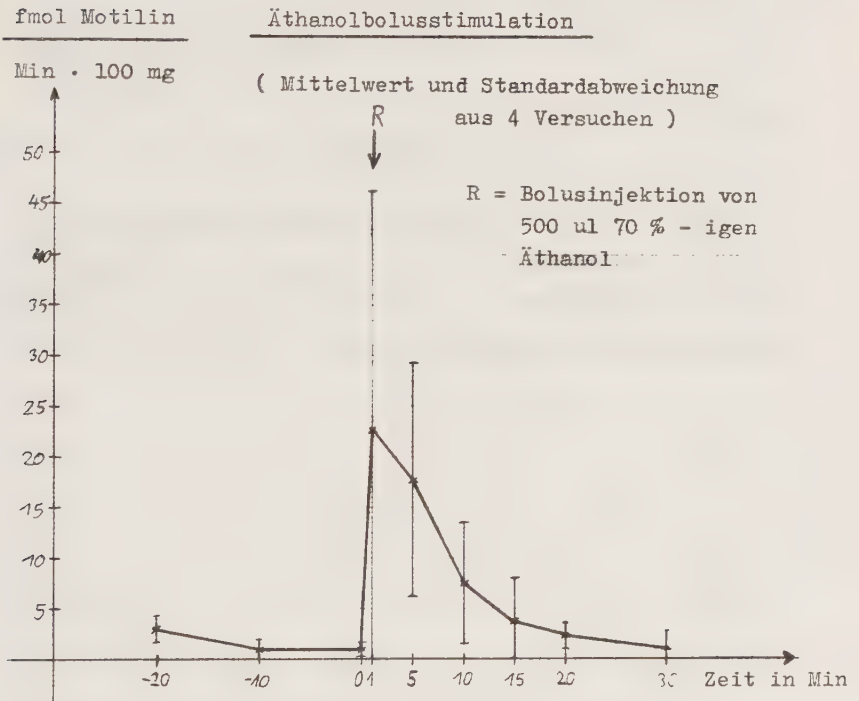


Tabelle 12 :

Basalwert	Wert bei 1 Min	Wert bei 5 Min		
X_1	X_2	X_3	$X_2 - X_1$	$X_3 - X_1$
5	41	53	36	48
4	181	108	177	104
4	43	30	39	26
0	19	31	19	31
Mittelwert :			67,8	52
Standardabweichung :			73,4	35,8

Diskussion :

70 - prozentiger Äthylalkohol vermag die Motilinsekretion zu stimulieren. Da aber normalerweise keine 70 - prozentige Äthanolkonzentration im Duodenum erreicht wird, und geringere Alkoholkonzentrationen bisher nicht untersucht wurden, muß die mögliche physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung des Äthanols für die Motilinsekretion noch offen bleiben.

Insbesondere wäre zu klären, ob eine von der Äthanolkonzentration abhängige Steigerung der Motilinfreisetzung zu erzielen ist, oder ob gar ein Reizmaximum wie bei Cholsäurestimulation existiert.

5. Testung verschiedener organischer Verbindungen

Im folgenden sollen noch einige Substanzen angeführt werden, die zu keiner signifikanten Zunahme der Motilinsekretion geführt haben.

a) Triglyceride

Wie weiter oben schon beschrieben, wurde Cholsäure bei dem Versuch mit Triglyceriden vermehrt Motilin freizusetzen als Lösungsvermittler für Fette benutzt. Es ergab sich für die Stimulation mit Triglyceriden und Cholsäure keine deutlich vermehrte oder verminderte Motilinausschüttung gegenüber der Perfusion mit der gleichen Cholsäurekonzentration allein. Die etwas verminderte Motilinkonzentration bei Stimulation mit Triglyceriden und Cholsäure (grüne Kurve mit den dreieckigen Wertepunkten in Abbildung 14) ist offenbar auf die zur Micellenbildung verbrauchte Cholsäurekonzentrationsminderung und individuelle Schwankungen zurückzuführen.

Somit ist festzustellen, daß Triglyceride keine Wirkung auf den Motilinausschüttungsmechanismus haben.

Aus der folgenden Abbildung 14 kann zusätzlich noch entnommen werden, daß eine Summation von verschiedenen Reizen (Cholsäurestimulation über 10 Minuten und Bolusstimulation mit Salzsäure) eine Addition der zu erwartenden Motilinnengen bewirkt.

d) Noradrenalin

Arterenol^R ist fast ausschließlich für α - Rezeptoren spezifisch . Adrenerge Rezeptoren , die in glatten Muskeln , die vom Sympathicus versorgt werden , vorkommen , können so durch Aterenol^R stimuliert werden . Die Zumischung von 1,5 Milliliter Aterenollösung zu 100 Milliliter Earle's hatte jedoch keine Veränderung der basalen Motilinfreisetzung zur Folge . Die Motilinsekretion wird also auch nicht vom Sympathicus beeinflusst.

e) Cholecystokinin (CCK)

Das reine Peptidhormon CCK wirkt nicht nur auf die Gallenblase (kontrahierend) , auf den Sphinkter Oddi (erweiternd) und auf die Enzymsekretion des Pankreas (fördernd) , sondern es acceleriert auch die Darmperistaltik (15 , 16) . Außerdem stimuliert das Hormon die Gallengensekretion aus der Leber und die Freisetzung von Insulin aus dem Pankreas . Die als Nebenwirkung des Hormons angegebene Stimulation der Motilität des Duodenums und die Beschleunigung der Darmperistaltik , die von empfindlichen Patienten gefühlt werden , könnten auch auf die Wirkung von Motilin , die ja in manchem ähnlich der des Cholecystokinin sein soll , zurückzuführen sein.

Es lag also nahe zu testen , ob CCK eine direkte Stimulation der Motilinsekretion bewirkt . Die mit 7,5 HE.

Cholecystokinin pro 64 ml Earle's durchgeführte Untersuchung erbrachte keine Veränderung der normalen basalen Motilinkonzentration beim Reizversuch.

Da bei CCK - Verabreichung jedoch über die Gallenblasenkontraktion und die gesteigerte Gallensekretion, die zu einem Großteil aus Cholsäuren besteht, aus der Leber vermehrt Cholsäure , deren direkt stimulierende Wirkung auf die Motilinsekretion bewiesen wurde , in das Duodenum gelangt , die Motilinzellen reizt und dadurch große Motilinnengen freisetzt , ist so eine mögliche Erklärung für die Beschleunigung der Darmperistaltik bei Cholecystographie mit Cholecystokinineinsatz geliefert.

B. Hemmversuche

Wie schon oben beschrieben wurde, gelingt es mit der Cholsäurestimulation, einen fast konstant hohen Motilinfreisetzungswert über längere Zeit zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde mit 31 mmolarer Cholsäurelösung (etwas unterhalb des Reizoptimums) über 55 Minuten stimuliert. In Abbildung 15 ist das Ergebnis aus 9 ähnlichen Versuchen zusammengestellt. Die schwarze, dicker gezeichnete Kurve zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung ohne Gabe eines zu testenden Hemmstoffes. Es ist ersichtlich, daß nach 5 bis 10 Minuten der hohe Motilinwert erreicht ist, der dann für die restlichen 45 Minuten aufrechterhalten bleibt (Plateauphase) .

Man kann nun versuchen mit einem bestimmten Stoff, der zusätzlich gegeben oder weggelassen wird , das Plateau bei weiter durchgeführter, konstanter Stimulation abzusinken . Gelingt dies mit einer Substanz , so ist die Absenkung des Plateaus ein Beweis dafür , daß eine Hemmung der Motilinsekretion stattfand.

1. Kalziumionenfreie

Nährlösung

Die grüne Kurve in Abbildung 15 mit den dreieckigen Wertepunkten zeigt den zeitlichen Verlauf einer versuchten Hemmtestung . Es wird dabei nach ca. 14 Minuten die zur Perfusion benutzte Nährlösung , die aus Earle's und

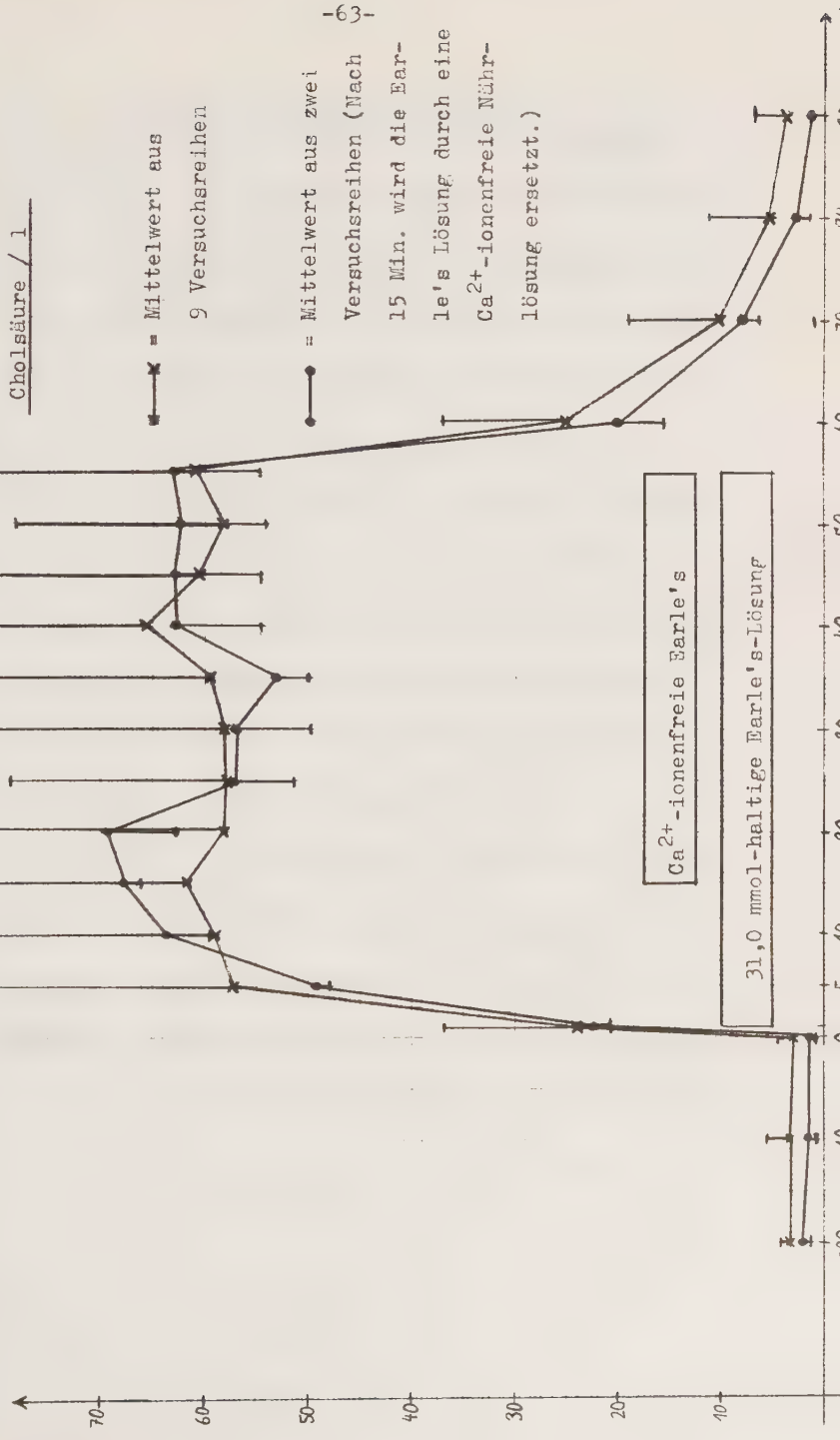
Abbildung 15

Stimulation mit 31 mmol

Cholsäure / l

fmol Motilin

Min · 100 mg



x = Mittelwert aus 9 Versuchsreihen

• = Mittelwert aus zwei Versuchsreihen (Nach 15 Min. wird die Earle's Lösung durch eine Ca²⁺-ionenfremie Nähr-lösung ersetzt.)

Cholsäurelösung zusammengesetzt war, durch eine Kalziumionenfreie Earle's ersetzt, die ebenfalls die gleiche Menge Cholsäurelösung (im Gemisch sind dann 31 mmol Cholsäure pro Liter) enthält . Wäre nun der Prozeß der Motilinausschüttung von Ca^{2+} - ionen abhängig, so müßte bei der Stimulation mit Ca^{2+} - ionenfreier Nährlösung ein deutlicher Abfall vom Plateau zu beobachten sein.

Da kein deutliches Absinken der Motilinfreisetzungsmenge eintritt , auch über die gesamten weiteren 40 Minuten der Stimulationszeit nicht , kann klar festgestellt werden , daß der Motilinsekretionsmechanismus nicht von Kalziumionen abhängig ist . Dies ließen auch schon vorher durchgeführte Versuche mit Säurebolusreizung errahnen . Hierbei war nämlich durch 0,12 ml einer 0,2 normalen Salzsäurelösung (Bolusinjektion) aus Mucosazellen , die mit Ca^{2+} - ionenfreier Earle's ernährt wurden, ebenso wie aus anderen Gewebstückchen , die mit Kalziumionen enthaltender Earle's perfundiert wurden , vermehrt Motilin freizusetzen.

Eine statistische Bearbeitung dieses Hemmversuchs mit Kalziumionenfreier Nährlösung ist wegen der geringen Versuchszahl (zwei) nicht sinnvoll.

2. Orciprenalin und Adrenalin

Es ist bekannt , daß die Darmmotilität durch β_1 - Rezeptoren, die durch Adrenalin und Orciprenalin besetzt werden können , gehemmt werden kann. Aufgrund dieser Tatsache sahen wir uns veranlaßt, Hemmversuche mit beiden β - Stimulatoren zu unternehmen.

In Abbildung 16 ist der zeitliche Ablauf der Tests zu verfolgen. Aus ihr ist ersichtlich, daß kein Abfall vom Plateauwert nach Gabe von Alupent^R (1,7 mg Orciprenalin pro Liter Nährlösung) und Adrenalin (2,5 mg Adrenalin pro Liter Earle`s) auftritt . Die in Klammern angegebenen Konzentrationen waren höher gewählt als die übliche Dosierung, um die Diffusion zu beschleunigen und den im Magendarmtrakt vorkommenden Abbau durch Fermente auszugleichen.

Die statistische Bearbeitung erfolgt wegen der geringen Versuchszahl (5) mit dem t - Test für paarige Stichproben (Siehe Biomathematik für Mediziner , Springer Verlag , 1975 , Seite 168) . Es wird die Differenz aus dem Mittelwert der Motilinkonzentrationen vor β - Stimulatorgabe (5 , 10 , 15 , 20 Min.) und dem mittleren Motilinwert nach dem Zusatz der β -Sympathomimetika (25 , 30 , 35 , 40 , 45 , 50 und 55 Min.) gebildet . Zu prüfen ist , ob der Erwartungswert der Verteilungsfunktion der Differenzen ungleich Null ist.

Nullhypothese : H_0 : $\tilde{\mu} = 0$

Gegenhypothese : H_1 : $\tilde{\mu} \neq 0$

Abbildung 16

Stimulation mit 15,5 mmolarer
Cholsäurelösung

fmol Motilin

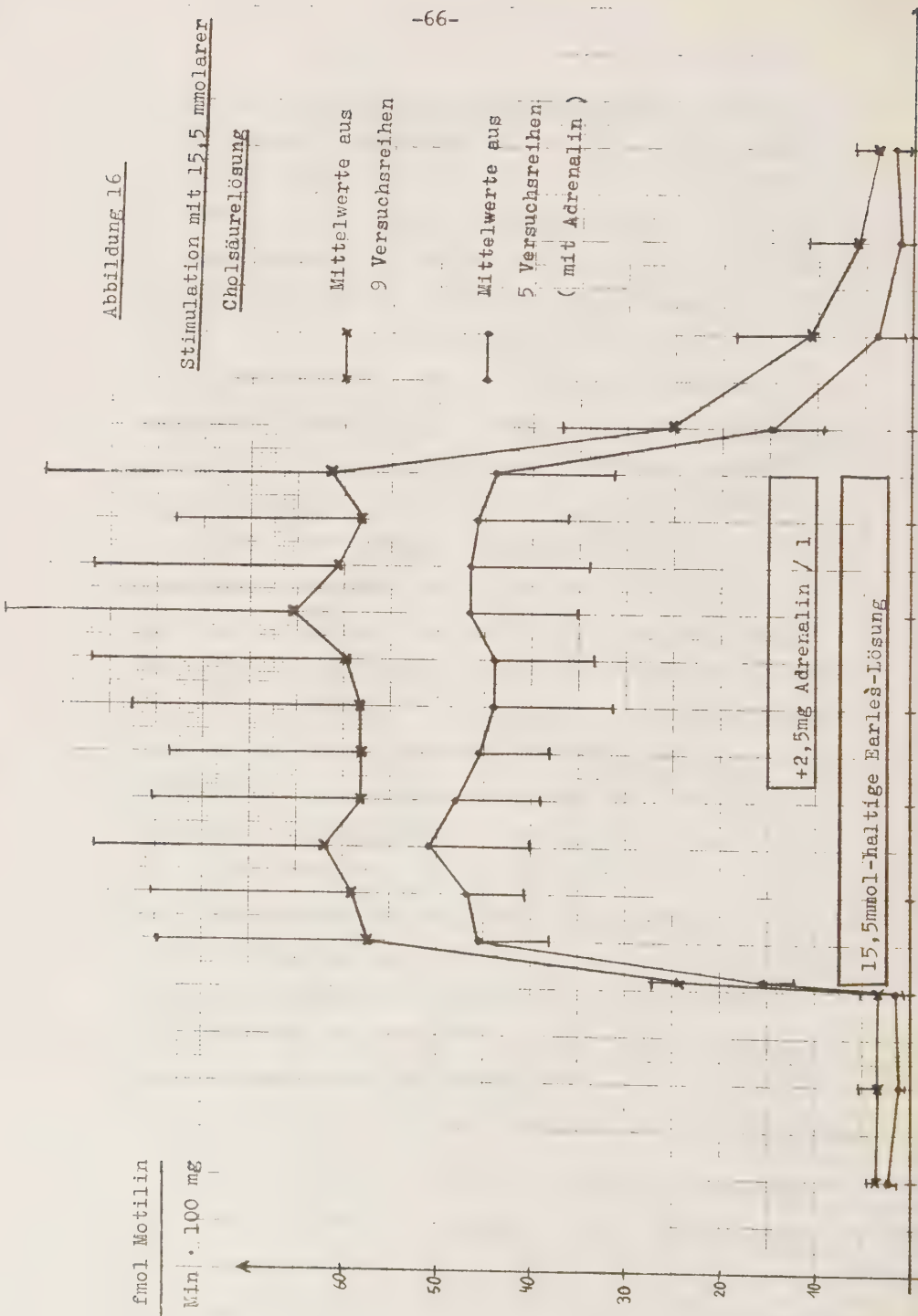
Min. 100 mg

Mittelwerte aus
9 Versuchsreihen

Mittelwerte aus
5 Versuchsreihen
(mit Adrenalin)

+2,5mg Adrenalin / l

15,5mmol-haltige Earles-Lösung



$$\text{Prüfgröße} : t = \frac{|\bar{d}|}{S} \sqrt{n}$$

mit $\bar{d}$ = Mittelwert von d_i

S^2 = empirische Varianz der d_i

In der folgenden Tabelle 13 sind die Mittelwerte der Motilinkonzentrationen vor (X_{1i}) und während (X_{2i}) der β - Stimulatorengabe in pg pro Minute und pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht angegeben.

Tabelle 13 :

X_{1i}	X_{2i}	$= d_i$	$(d_i - \bar{d})$	$(d_i - \bar{d})^2$
171	152	19	10,6	112,36
149	154	- 5	- 13,4	179,56
126	93	33	24,6	605,16
176	180	- 4	- 12,4	153,76
124	125	- 1	- 9,4	88,36
		$\bar{d} = 8,4$	$\sum_{i=1}^5 (d_i - \bar{d})^2 = 1139,2$	

$$S^2 = \frac{1139,2}{(5-1)} = 284,8$$

$$S = \sqrt{284,8} = 16,876$$

$$\text{Prüfgröße} : t = \frac{8,4}{16,876} \cdot \sqrt{5} = 1,113$$

Das zu überschreitende Quantil t_f , $1-\alpha/2$ der t_f - Verteilung mit $f = n - 1$ Freiheitsgraden beträgt :

$$t_{4, 0,975} = 2,776 > 1,113 = t$$

daraus folgt : H_0 wird beibehalten.

Es tritt also nach Adrenalin - bzw. nach Orciprenalin-
gabe kein statistisch belegbarer Abfall vom Plateauwert
auf. Somit haben die beiden β - Sympathomimetika keine
nachweisbare Hemmwirkung auf die Motilinausschüttung .
Die beschriebene Hemmwirkung von β_1 - Stimulatoren auf
die Darmmotilität muß also durch andere Mechanismen zu-
stande kommen.

Auf Hemmwirkung wurden zusätzlich noch einige andere
Verbindungen getestet . Die verwendeten Konzentrationen
sind dabei zum Aufbau eines großen Diffusionsgradienten
und wegen der Anwesenheit von abbauenden Enzymen des
Mucosagewebes höher als bei der üblichen intravenösen
Dosierung gewählt worden.

3. Verapamil

Schon bei Salzsäurebolusinjektionsversuchen mit isop-
tinhaltiger Nährlösung war kein klares Absinken der Mo-
tilinfreisetzungsmenge zu erkennen , das auf der kal-
ziumantagonistischen Wirkung des Verapamils beruhen
könnte . Um ganz sicherzugehen, wurde ein Plateauhemm-
test mit 1,25 mg Verapamil in 100 ml Nährlösung,
die auch noch die 31 mmol Cholsäure enthielt , die zur
Aufrechterhaltung des Plateauwertes nötig sind, durch-
geführt . Ein Abfall von der Plateaumotilinkonzentration
blieb genauso wie vorher bei der kalziumionenfreien Nähr-
lösung aus . Isoptin^R besitzt also keine Hemmwirkung
auf den Motilinsekretionsmechanismus.

4. Glucagon und Insulin

Die beiden Pankreashormone wurden auch mit Hemmversuchen getestet . Dabei wurden nach 16-minütiger Stimulationszeit mit 3l mmol Cholsäure Perfusionslösungen verwendet , die zusätzlich noch 0,9 mg Glucagonhydrochlorid pro 100 ml Nährlösung bzw. 74 IE. Insulin pro 100 ml Earle's enthielten . Eine direkte Hemmwirkung (Abfall vom Plateau) trat bei beiden Hormonen nicht auf.

Ob indirekt (über das Glucoseangebot für die Zellen ...) eine Wirkung besteht , ist mit in vitro Versuchen nicht zu klären.

5. Pentagastrin

Pentagastrin ist das C-terminale Endstück von Gastrin, das im Magenantrum , Duodenum und Jejunum produziert wird . Bei Gabe von 0,05 mg Pentagastrin / 100 ml zur Perfusionslösung während der Plateauphase ist kein Absinken der Motilinkonzentration zu beobachten . Somit ist für Pentagastrin keine direkte Hemmwirkung auf den Motilinausschüttungsmechanismus zu zeigen.

Diskussion :

Aus obigen Ergebnissen läßt sich schließen , daß zwar bestimmte Substanzen (Säuren , Laugen , Äthylalkohol und Cholsäure) das Motilin vermehrt freisetzen , die sezernierte Menge kann jedoch durch bekannte Transmitter des Reizleitungssystems weder gehemmt noch gefördert werden . Die pro Zeiteinheit ausgeschüttete Motilinmenge hängt nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen einzig von der Art und Stärke (Konzentration) des Reizes und der Qualität der Nährlösung ab.

IV. Synopsis

Das Peptidhormon Motilin , das von Motilinzellen des Dünndarms gebildet wird , gelangt immer in geringer Konzentration (Basalwert) in die das Gewebe umspülende Nährlösung . Bei Verwendung einer Perfusionsapparatur läßt sich in vitro untersuchen , welche Stoffe die Motilinfreisetzung beeinflussen.

Die schon in vivo erprobten Reize mit Salzsäure- und Trispufferbolus waren auch bei in vitro Bedingungen in der Lage , Motilin in erhöhter Konzentration freizusetzen . Die neu getesteten Bolusreize mit Natronlauge und Natriumbikarbonat brachten das gleiche Ergebnis.

Eingehendere Untersuchungen mit konstant niedrigen pH-Werten der Perfusionslösungen machten klar , daß mit steigender Wasserstoffionenkonzentration auch die durch den Reiz zu gewinnende Motilinkonzentration zunimmt.

Besonders wichtig ist aber die Erkenntnis der Stimulierbarkeit des Motilinsekretionsmechanismus durch Cholsäure , die in der Gallenflüssigkeit physiologischerweise in einer Konzentration von 20 bis 230 mmol / l enthalten ist . Hier ergab sich für einen Reiz von 40 bis 60 mmol Cholsäure pro Liter Nährlösung eine optimale Motilinausschüttung , und bei Vergrößerung der Reizkonzentration sank die Hormonfreisetzung wieder ab . Bei sehr

großen Cholsäurereizkonzentrationen wurde sogar der Basalwert unterschritten . Dies spricht dafür , daß der Vorgang der Motilinfreisetzung ein aktiver Prozeß ist. Wäre es nämlich ein passives Ereignis , eine physikalische oder chemische Herauslösung des Motilins , so dürfte für eine weitere Reizkonzentrationssteigerung kein Abfall stattfinden , sondern eher eine Erhöhung der Motilinkonzentration.

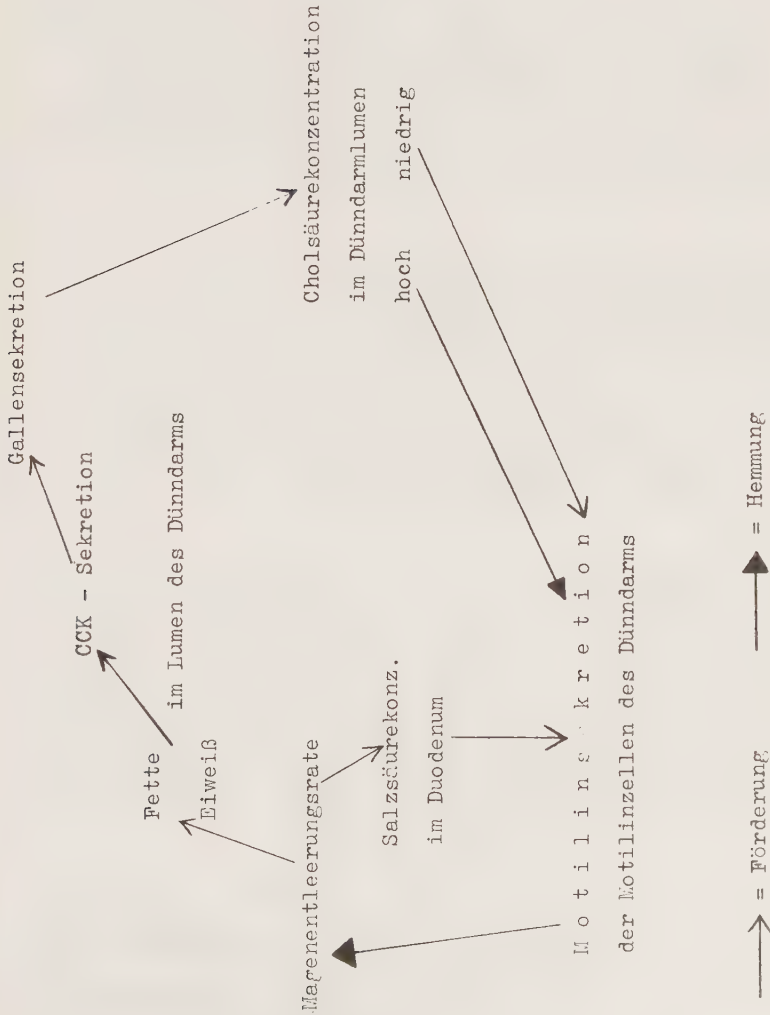
Über den molekularen Mechanismus der Motilinfreisetzung sind bislang keine Aussagen zu machen , zumal keine der heute bekannten Rezeptoren der Zellmembran bei der Sekretion des Peptids beteiligt sind : Die Untersuchung eines möglichen Einflusses des Sympathicus und des Parasympathicus auf die Hormonsekretion verlief negativ, denn Acetylcholin und Noradrenalin hatten bei Zugabe zur Nährlösung keine Veränderung des basalen Motilinwerts zur Folge.

Weiterhin führte weder Kalziumionenentzug bzw. der Kalziumantagonist Verapamil noch die Verabreichung anderer Hormone des Magen-Darm-Trakts (Insulin , Glucagon, Gastrin) zu faßbaren Veränderungen . Weitere Untersuchungen werden die Angriffspunkte der Stimulatoren an der Motilinzelle zu klären haben.

Nach den bisherigen Erkenntnissen kann die Motilinsekretion nach dem folgenden Schema 3 in einen Regelkreis

zur Magenentleerung eingefügt werden.

Schema 3 :



V. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde der Einfluß unterschiedlicher chemischer Verbindungen , nämlich Salzsäure , Natronlauge , Natriumbikarbonat , Tris - hydroxymethyl-aminomethan , Cholsäure , Äthylalkohol , Triglyceride, Acetylcholin , Noradrenalin , Pentagastrin und Cholecystokinin - Pankreozymin auf die Freisetzung des Gewebshormons Motilin aus isolierten Mucosastückchen des Duodenums des Schweines untersucht.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß Salzsäure und Cholsäure die Motilinsekretion dosisabhängig stimulieren . Alkalisierung bzw. die Verabreichung von Äthylalkohol haben demgegenüber nur eine geringe Wirkung auf die Motilinfreisetzung . Die anderen Testsubstanzen zeigten keinen Effekt.

Diese Befunde lassen vermuten , daß Säuren die motilinspeichernden Zellen des Duodenums direkt zu stimulieren vermögen . Sie stehen im Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen , die eine erhöhte Motilinfreisetzung nach intraduodenaler Verabreichung von Salzsäure in vivo ergeben haben.

Es erscheint denkbar , daß die Cholsäure , die, im Gegensatz zur Salzsäure , auch unter physiologischen Bedingungen im oberen Dünndarm vorkommt , der physiologische Stimulator der Motilinsekretion ist.

VI. Literaturverzeichnis

- (15) Backlund, V. und Peterson, H. J. Die Verwendung des Cholecystokinins in der Chirurgie der Gallengänge. Der Radiologe, 1965, 5, 100 - 104.
- (16) Backlund, V. Die Verwendung des Cholecystokinins in der Röntgendiagnostik . Der Radiologe, 1970, 10, 36 - 39.
- (1) Brown, J. C., Mutt, V. & Dryburgh, J. R. The Further Purification of Motilin A Gastric Motor Activity Stimulating Polypeptide from the Mucosa of the Small Intestine of Dogs. Canad. J. Physiol. Pharm. 1971, 49, 399 - 405.
- (2) Brown, J. C. & Dryburgh, J. R. Discovery of Motilin. Scand. J. Gastroent. 1976, 11, Suppl. 39, 15 - 17.
- (4) Dryburgh, J. R. , Brown, J. C. Radioimmunoassay for Motilin. Gastroenterology, 1975, 68, 1169 - 1176.
- (9) Itoh, Z., Honda, R., Hiwatashi, K., Takeuchi, S., Aizawa, I., Takayanagi, R. & Couch, E. F. Motilin-Induced Mechanical Activity in the Canine Alimentary Tract. Scand. J. Gastroent. 1976, 11, Suppl. 39, 93 - 110.
- (11) Jennewein, H. M., Hummelt, H., Siewert, R., et al. The Motor-Stimulating Effect of Natural Motilin on the Lower Esophageal Sphincter,

- Fundus, Antrum and Duodenum in Dogs.
Digestion, 1975, 13, 246 - 250.
- (10) Koch, H., Domschke, S., Belohlavek, D., et al.
Gastric Mucosal Blood Flow and Pepsin
Secretion in Dogs - Stimulation by
13-Nle-Motilin. Scand. J. Gastroent.
1976, 11, 93 - 96.
- (14) Lux, G., Rösch, W., Domschke, S., Domschke, W.,
Wünsch, E., Jaeger, E. & Demling, L.
Intravenous 13-Nle-Motilin Increases
the Human Lower Esophageal Sphincter
Pressure. Scand. J. Gastroent. 1976,
11, Suppl. 39, 75 - 79.
- (8) Mitznegg, P., Bloom, S. R., Christofides, N.,
Besterman, H., Domschke, W., Domschke,
S., Wünsch, E. & Demling, L. Release
of Motilin in Man. Scand. J. Gastroent.
1976, 11, Suppl. 39, 53 - 56.
- (7) Mitznegg, P., Bloom, S. R., Domschke, W., et al.
Release of Motilin after Duodenal Aci-
fication. Lancet. 1976, I, Nr. 7965,
888 - 889.
- (6) Mitznegg, P., Bloom, S. R., Domschke, W., et al.
Pharmacokinetics of Motilin in Man.
Gastroenterology. 1977, 72, 413 - 416.
- (17) Mitznegg, P., Domschke, W., Domschke, S., Beloh-
lavek, D., Sprügel, W., Strunz, U.,
Wünsch, E., Jäger, E. & Demling, L.
Effects of in Vivo Administration of

- Pentagastrin, Secretin and 13-Nle-Motilin on the in Vitro Incorporation of ^{14}C - Leucine into Protein of Human Gastric Mucosa. Scand. J. Gastroent. 1976, 11, 657 - 660.
- (13) Ruppin, H., Domschke, S., Domschke, W., et al.
Effects of 13-Nle-Motilin in Man - Inhibition of Gastric Evacuation and Stimulation of Pepsin Secretion. Scand. J. Gastroent. 1975, 10, 199 - 202.
- (12) Strunz, U., Domschke, W., Mitznegg, P., et al.
Analysis of the Motor Effects of 13 - Norleucine Motilin on the Rabbit, Guinea Pig, Rat and Human Alimentary Tract in Vitro. Gastroenterology. 1975, 68, 1485 - 1491.
- (5) Strunz, U., Domschke, W., Domschke, S., et al.
Gastroduodenal Motor Response to Natural Motilin and Synthetic Postition 13-Substituted Motilin Analogues : A Comparative in Vitro Study. Scand. J. Gastroent. 1976, 11, 199 - 203.
- (3) Wünsch, E., Brown, J. C., Deimer, K. H., et al.
Zur Synthese von Norleucin - 13 - Motilin. Z. Naturforsch. 1973, 28c, 235 - 240.

Herrn Professor Dr. P. Mitznegg möchte ich danken für die Überlassung des Themas , die wertvolle Unterstützung während der Arbeit und für die Bereitstellung der Substanzen für den Radioimmunoassay. Auch seinen Mitarbeitern bin ich für die vielen kleinen Hilfen und Ratschläge dankbar. Besonderer Dank gebührt ferner Herrn Dr. Strunz für die Beschaffung von wichtigen Substanzen und Herrn Dr. Gonselmann für die Beratung bei der Erstellung des statistischen Teils meiner Arbeit.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 11. Dezember 1950 als einziges Kind des Werkmeisters Karl König und seiner Ehefrau Franziska in Schönhaid bei Wiesau geboren.

1957 trat ich in die Grundschule in Wiesau ein und wechselte 1962 in das Stiftland-Gymnasium Tirschenreuth über, wo ich 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Am 1. Juli 1971 wurde ich zur Bundeswehr nach Weiden einberufen, wo ich den gesamten Wehrdienst ableistete. Ab Oktober 1972 studierte ich in Erlangen zuerst vier Semester Biologie und Chemie.

Im Wintersemester 1974/75 wurde ich zum Studium der Humanmedizin zugelassen. Nach Anrechnung eines Fachsemesters legte ich im März 1976 das Physikum ab.

Am 10. April 1980 bestand ich den schriftlichen Prüfungsteil des dritten Abschnitts und am 2. Juni 1980 das mündliche Examen.

Erlangen, 3. Juni 1980

Copy - Center 2000
852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131 - 26197